CHARAKTERISIERUNG SCHNELLMARKIERTER, HOCHMOLEKULARER RNS BEI STERILEN ZELLKULTUREN VON PETROSELINUM SATIVUM

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

ULRICH SEITZ

aus Stuttgart

1970

CHARAKTERISIERUNG SCHNELLMARKIERTER, HOCHMOLEKULARER RNS BEI STERILEN ZELLKULTUREN VON PETROSELINUM SATIVUM

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Seitz
aus Stuttgart
1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.Februar 1970

Dekan: Prof. Dr. W. Seyffert

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Richter
Prof. Dr. W. Seyffert
Dozent Dr. K. Zetsche

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	4
1) Kulturbedingungen	4
2) Markierung mit Radioisotopen	9
3) Präparation der Gesamtnucleinsäuren	10
4) Präparation der hochmolekularen RNS	11
5) RNase-Abbau	11
6) Chromatographische Trennverfahren	11
7) Basenanalysen nach ^{32}P-Markierung	13
8) Zentrifugationsverfahren	14
9) Polyacrylamidgel-Elektrophorese	16
10) Zahl der Versuche	18
11) Chemikalien	19
12) Abkürzungen	19
III. ERGEBNISSE	20
1) Kulturversuche	20
2) Markierungsversuche mit radioaktiven Vorstufen der RNS	23
a) ^{32}P-Orthophosphat	23
1-stündiger Einbau	24
30 min-Einbau	25
Dauereinbau	26
"Pulse"-Experimente	27
b) ^{3}H-Uridin	30
3) "Chase"-Experimente	31
4) Fraktionierende Zentrifugation von Zellhomogenaten	32
5) Basenzusammensetzung	34
6) Dichtegradientenzentrifugation	36
7) Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese	40
IV. DISKUSSION	46
V. ZUSAMMENFASSUNG	50
VI. LITERATURVERZEICHNIS	51

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0112

EINLEITUNG

Nach den heute gültigen Vorstellungen über den Mechanismus der Proteinbiosynthese wird an der DNS-Matrize messenger-RNS gebildet (Transcription), die dann Enzym- und Strukturproteine mit Hilfe der Ribosomen codiert (Translation). Diese Anschauung geht auf Untersuchungen an Bakterien zurück, die anstelle komplizierter Chromosomen ein einfaches Lineom enthalten. Bei Eukaryonten werden die Verhältnisse durch den Zellkern und die Kompartimentierung des Cytoplasmas kompliziert. Über tierische Zellen existieren mehr Daten als über pflanzliche, weil deren Zellulosewand mechanisch aufgebrochen werden muß, und dabei können unter Umständen Makromoleküle wie die Nucleinsäuren zerstört werden. Außerdem erschweren zahlreiche Pflanzenstoffe wie Polyphenole, Polysaccharide, Carbonsäuren die Untersuchungen.

Die Synthese und der Weg der messenger-RNS in Pflanzenzellen ist noch immer unklar; es ist also durchaus berechtigt, weitere Daten zur Nucleinsäurebiosynthese höherer Pflanzen zu sammeln.

Eines der am häufigsten verwendeten Verfahren zur Trennung von Nucleinsäuren ist die Säulenchromatographie an methyliertem Serumalbumin. Nach kurzfristiger Inkubation mit radioaktiven Vorstufen der Nucleinsäuren findet man auf MAK-Chromatogrammen folgende schnellmarkierte RNS-Komponenten.
1) Im Bereich der niedermolekularen RNS zwischen 4s und 5s RNS haben CHERRY (1964), KEY u. INGLE (1964) und andere Autoren eine schnellmarkierte Komponente gefunden.
2) CHERRY (1964) beschreibt im Bereich der DNS von Erdnußkotyledonen eine hohe Markierung, obwohl diese Zellen sich nicht mehr teilen. Er ordnet diese Synthese der RNS zu. RICHTER und SENGER (1965) konnten ähnliche Verhältnisse bei Chlorella beschreiben.
3) Im Bereich der hochmolekularen RNS wird eine schnellmarkierte Fraktion bei höherer NaCl-konzentration als die 25s RNS eluiert (CHERRY u. van HUYSTEE 1965; LONBERG-HOLM 1967; YOSHIDA

u.Mitarb. 1967). Auf Grund der Befunde an Bakterien wird für messenger-RNS eine DNS-ähnliche Basenzusammensetzung gefordert. Diese Ähnlichkeit läßt sich tatsächlich für diese schnellmarkierte RNS nachweisen (KEY u. INGLE 1964; LOENING 1965 und andere Autoren). LIN u.Mitarb. (1966) haben diese Komponente an den Polysomen von Sojawurzeln wiedergefunden und deshalb als messenger-RNS gedeutet.

Für die Charakterisierung von messenger-RNS werden i.a. folgende Kriterien herangezogen: 1) Stimulierung der Proteinsynthese in vitro; 2) Basenzusammensetzung (DNS-ähnlich); 3) kurze Lebensdauer in vivo; 4) Bindung an Polysomen; 5) schnelle Markierbarkeit mit radioaktiven Vorstufen der RNS. Alle diese Kriterien sind für sich allein betrachtet nicht ausreichend, um messenger-RNS zu charakterisieren. So liefert z.B. die schnelle Markierbarkeit allein noch keinerlei Beweis für den messenger-Charakter einer bestimmten RNS-Komponente. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch andere RNS-Fraktionen ähnlich schnell synthetisiert werden. MURPHY u. LOVETT (1966) und LOENING (1967) konnten eine schnellmarkierte RNS, die eine Vorstufe der ribosomalen RNS darstellt, nachweisen.

Bei allen Arbeiten, die sich mit schnellmarkierter RNS beschäftigen, ist wichtig, daß bakterienfreie Untersuchungsobjekte verwendet werden. HOCK (1967) und LONBERG-HOLM (1967) konnten zeigen, daß das Markierungsmuster bei Bakterienverunreinigung verfälscht wird, weil Bakterien mit ihrem großen Stoffumsatz sehr viel schneller radioaktives Material als Zellen höherer Pflanzen in ihre Nucleinsäuren einbauen.

In der vorliegenden Arbeit sind derartige Schwierigkeiten ausgeschlossen, da alle Versuche mit sterilen Zellkulturen durchgeführt wurden. Es wurde Wurzelkallus unter Dauerdunkelbedingungen kultiviert, weil Chloroplasten ihre eigenen Nucleinsäuren besitzen und dadurch die Untersuchung der Nucleinsäurebiosynthese sehr komplizieren können. Ein weiteres Ziel war, möglichst einheitliches Zellmaterial für derartige Untersuchungen zu erhalten.

Unter diesen definierten Bedingungen wurde nach kurzfristiger Markierung schnellmarkierte RNS untersucht. Ausgangspunkt der Untersuchungen sind Trennungen an methyliertem Serumalbumin. Es wurde nur die schnellmarkierte RNS im hochmolekularen Bereich bearbeitet, die niedermolekularen, schnellmarkierten Komponenten wurden aus den Untersuchungen ausgeklammert. Im ersten Teil der Arbeit sollen die biologischen Eigenschaften dieser schnellmarkierten, hochmolekularen RNS wie Lebensdauer, Bindung an Zellpartikeln oder das Verhalten bei verschiedenen Inkubationszeiten geprüft werden. Im zweiten Teil wurde mehr auf physikalisch-chemische Eigenschaften wie Molekülgröße, Molekulargewicht und Basenzusammensetzung geachtet. Da die Trennqualität der MAK-Säulen im hochmolekularen Bereich nicht sehr gut ist, wurden parallel andere Trennmethoden durchgeführt. Hierbei tritt das Problem auf, schnellmarkierte Komponenten bei verschiedenen Trennmethoden einander zuzuordnen. Als Kennzeichen bietet sich zunächst die Basenzusammensetzung an. Als weiteres Kriterium sollte versucht werden, die entsprechende Komponente selektiv zu markieren.

Wenn im folgenden von niedermolekularer (nm RNS) und von hochmolekularer RNS (hm RNS) gesprochen wird, sind diese Begriffe ganz neutral ohne Berücksichtigung der Funktion gemeint. Die beiden hochmolekularen Komponenten werden wegen ihres Vorkommens in den Ribosomen auch als ribosomale (rRNS) bezeichnet. Solange die messenger-RNS (m-RNS) noch nicht eindeutig bestimmt ist, sollte die wertungsfreie Bezeichnung schnellmarkierte RNS verwendet werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1) Kulturbedingungen

Alle Versuche wurden mit Suspensionskulturen von Petroselinum sativum* durchgeführt.

a) Stammkulturen: Das Kallusgewebe** wurde auf einem vollsynthetischen Nährmedium mit 1% Agar angezogen.

I	Makroelemente, Spurenelemente, Saccharose, Inosit nach MURASHIGE + SKOOG (1962) Vitamine n. BERGMANN (1967)	Kinetin, IES n. MURASHIGE + SKOOG (1962)	1	a Aminosäuren n. KOBLITZ + HAGEN (1962)
				b 0.3% Hefeextrakt + Glycin n. MURASHIGE + SKOOG (1962)
			1-Naphthylessigsäure n. BERGMANN (1967)	
			2	a Aminosäuren n. KOBLITZ + HAGEN (1962)
			2.4-D. n. BERGMANN + BERGER (1966)	b 0.3% Hefeextrakt + Glycin n. MURASHIGE + SKOOG (1962)
II	Makroelemente, Spurenelemente, Saccharose, Inosit nach MURASHIGE + SKOOG (1962) Vitamine n. BERGMANN (1967)		1	a Aminosäuren n. KOBLITZ + HAGEN (1962)
			1-Naphthylessigsäure n. BERGMANN (1967)	b 0.3% Hefeextrakt + Glycin n. MURASHIGE + SKOOG (1962)
			2	a Aminosäuren n. KOBLITZ + HAGEN (1962)
			2.4-D. n. BERGMANN + BERGER (1966)	b 0.3% Hefeextrakt + Glycin n. MURASHIGE + SKOOG (1962)

Tabelle 1: Zusammenfassung der geprüften Kulturmedien für Petroselinum sativum-Gewebekulturen.

---

* Petroselinum sativum Hofm. (Umbelliferae).

** Das Kallusgewebe wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr.E.Reinhard, Tübingen zur Verfügung gestellt.

Verschiedene Mediumzusammensetzungen wurden nach folgenden Kriterien beurteilt: 1) Kallusgewebe sollte farblos bleiben; 2) sollte gutes Wachstum zeigen; 3) vollsynthetische Medien sind gegenüber komplexen vorzuziehen (Tabelle 1).

Da anfänglich noch nicht genügend Versuchsmaterial zur Verfügung stand, wurde auf eine quantitative Auswertung verzichtet. Für Petroselinum erwies sich das Medium I,2a als am besten geeignet. Es hatte folgende Zusammensetzung:

Makroelemente (nach MURASHIGE u. SKOOG 1962)

	mg/l Nährlösung
KNO_3	1 900
NH_4NO_3	1 650
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Na_2EDTA	37.2
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8

Spurenelemente (nach MURASHIGE u. SKOOG 1962)

H_3BO_3	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.9
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
KJ	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025

Kohlenhydrate (nach MURASHIGE u. SKOOG 1962)

Saccharose	30 000
meso-Inosit	100

Vitamine (nach BERGMANN 1967)

Nicotinsäure	0.5
Thiaminiumdichlorid	0.1
Pyridoxolhydrochlorid	0.1

Wuchsstoffe

IES (Indol-(3)-essigsäure)	2.0
Kinetin (Furfurylaminopurin)	0.2
2.4-Dichlorphenoxyessigsäure	0.1

(Die IES- und Kinetinmenge nach MURASHIGE u.SKOOG 1962; 2.4D-Menge nach BERGMANN u.BERGER 1966).

Aminosäuren (nach KOBLITZ u.HAGEN 1962)

L-Alanin	29.7
-Aminobuttersäure	26.0
L-Arginin·HCl	3.1
L-Asparagin	3.8
L-Asparaginsäure	1.7
L-Glutamin	0.3
L-Glutaminsäure	15.7
Glycin	2.7
L-Histidin	0.05
L-Leucin	5.0
L-Lysin·HCl	2.0
DL-Methionin	0.05
DL-Phenylalanin	0.05
L-Prolin	1.9
L-Serin	12.8
DL-Threonin	4.1
L-Tyrosin	0.05
DL-Valin	2.3

Entgegen den Angaben von KOBLITZ u.HAGEN wurde Hydroxyprolin nicht zugegeben, dagegen enthielt das Medium 3.0 mg L-Cystin im Liter.

Das Medium wurde auf pH 5.6 eingestellt. Der fertige Nähragar (1 %ig) wurde 3 mal 1 h bei 100°C sterilisiert. Die Kultur erfolgte in 300 ml Erlenmeyer Kolben bei 26°C (Konstantraum) im Dauerdunkel. Nach 6-8 Wochen mußten die Kulturen auf frische Nährböden übertragen werden.

b) Suspensionskulturen: Um eine homogene Suspension zu erhalten,

wurden Kallusklumpen vom Agar in flüssiges Nährmedium übertragen und in Algenanzuchtröhren aus Jenaer-Glas (42 x 3.6 cm nach KUHL u.LORENZEN 1964) mit steriler Luft begast (Aquarienbelüfter Aisa, Mod.300). Bei dieser Behandlung zerfallen die Klumpen; es bildet sich eine Zellsuspension, die leicht vom kompakten Material abgetrennt werden kann. Diese Suspension läßt sich kontinuierlich weiterkultivieren.

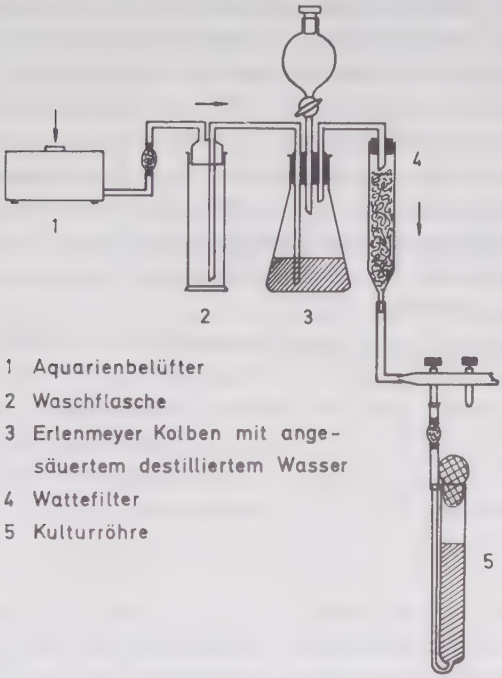


Abb.1: Schema der Kulturanlage für die Anzucht von Petroselinum-Zellkulturen.

Das Nährmedium hatte die gleiche Zusammensetzung wie für die Stammkulturen. Der Fe-EDTA-Komplex wurde allerdings erst nach

dem Autoklavieren (15 min, bei 0.9 atü ≙ 115°C) steril zugegeben. Der pH der Nährlösung betrug vor dem Autoklavieren 5.6. Die Kultur erfolgte im Dauerdunkel bei 26°C im Konstantraum. Nach 4 - 9 Tagen wurden die Kulturen in neues Nährmedium überführt. Alle Arbeiten wurden in einem UV-sterilisierten Impfkasten durchgeführt.

Wachstumsmessungen

Als Maß für das Wachstum wurde die Zunahme des Gesamtstickstoffs, die Zunahme des Trockengewichts und des gepackten Zellvolumens herangezogen. Es wurden 11 Röhren mit 200 ml Zellsuspension gleicher Zelldichte angesetzt und in Abständen von 24 h jeweils 1 Röhre zu Wachstumsbestimmungen entnommen.

1) Der Gesamtstickstoffgehalt wurde nach der Kjeldahl-Methode bestimmt (Mikrokjeldahl-Apparatur der Firma F.Keiner, Hamburg). Vor der Veraschung waren die Zellen gewaschen worden.

2) Die Trockengewichtsbestimmungen erfolgten nach vorherigem Waschen der Zellen in Stannioltiegelchen. Die Trockenzeit betrug 12 h bei 105°C.

3) Das gepackte Zellvolumen wurde nach der Hämatokrit-Methode ermittelt. Da im Handel erhältliche Hämatokritröhrchen zu enge Kapillaren haben, mußten Röhrchen angefertigt werden, die eine Graduierung von 0.8 cm^3* und einen Innendurchmesser von 0.4 cm hatten. In diese wurden 2.0 ml Zellsuspension einpipettiert und bei 3 400 Upm 6 min in einer Phywe P3/6 ausgeschleudert.

Zellzahl

Die Zellzahl der einzelnen Zellkolonien wurde folgendermaßen bestimmt: der Objektträger wurde blind auf dem Mikroskop-Objekttisch verschoben und die Zellen der Zellkolonie, die sich in der Mitte des Gesichtsfeldes befand (Fadenkreuz), wurden ausgezählt. Die Zahl der Stichproben betrug 500.

Mikrophotographie

Die Durchlichtmikrophotografien wurden mit einem Zeiss-Mikroskop und einer Practica IV Spiegelreflexkamera auf Agfa-Agepe-Film hergestellt.

---

* 1 Teilstrich ≙ 0.01 cm^3

2) Markierung mit Radioisotopen

Einbau von ^{32}P-Orthophosphat

Folgende Parameter für den Einbau anorganischen Phosphats in die Zellen einer Petroselinum sativum-Zellsuspension wurden geprüft: 1) Zelldichte; 2) eingesetzte ^{32}P-Menge; 3) Vorinkubationszeit im phosphatfreien Medium. Als kriterium für die Einbaurate wurde die relative spezifische Aktivität der hochmolekularen RNS gemessen.

Phosphatverarmung: Um hohe Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat zu erhalten, müssen die Zellen einige Zeit vor der Zugabe des radioaktiven Materials in phosphatfreiem Medium (I,2a Medium ohne kH_2PO_4) kultiviert werden. Die Versuche erfolgten am 5.-9.Tag nach Kulturbeginn immer zur gleichen Tageszeit. Der Inhalt von 2-3 Kulturröhren wurde vereinigt. Die Zellen wurden durch ein Vliesline*-Filter vom Medium abgetrennt, mit 750 ml phosphatfreiem Medium gewaschen und im selben Medium (Endmenge 200 ml) resuspendiert. Das gepackte Zellvolumen dieser Suspension betrug 0.35 cm^3/ml. Diese umständliche Vorarbeit war nötig, weil die Zellen bei Zentrifugation so geschädigt wurden, daß sie kein ^{32}P-Orthophosphat einbauen konnten. Alle Arbeiten wurden im UV-sterilisierten Impfkasten mit autoklavierten Geräten vorgenommen.

Bei Kurzzeitmarkierungsversuchen (5-60 min) betrug die Vorinkubationszeit im phosphatfreien Medium (26°C, DD) 12 Stunden, bei Langzeitexperimenten (36 h) 2 Stunden.

^{32}P-Inkubation: Bei kurzfristiger Inkubation wurden 20 µc/ml trägerfreies ^{32}P-Orthophosphat, bei Dauereinbauversuchen 10 µc/ml unter sterilen Bedingungen zugegeben. Waren die Einbauzeiten sehr kurz gewählt (5-15 min), wurde der Einbau in einem NaCl-Eisbad abgebrochen und die Zellen in der Kälte abzentrifugiert. Bei allen länger dauernden Versuchen genügte es, die Zellen direkt in einer gekühlten Zentrifuge vom Inkubationsmedium abzutrennen.

---

* Die Vliesline war durch 24-stündiges Wässern von wasserlöslichen Stoffen befreit worden.

Markierung mit ^{3}H-Uridin

Zellen aus 3 Kulturröhren wurden vereinigt und mit Normalmedium auf 250 ml aufgefüllt. Zu dieser Suspension wurden 3 µc/ml Uridin-5-T zugegeben. Nach 15 min wurde der Einbauvorgang durch Einstellen der Suspension in eine NaCl-Eismischung abgebrochen. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie bei ^{32}P-Einbauversuchen.

3) Präparation der Gesamtnucleinsäuren

Phenolmethode: Nach Abtrennen der Zellen vom Nährmedium wurde mit Tris·HCl-Puffer pH 7.5 (0.05 m Tris, 0.002 m $MgSO_4$) gewaschen und das Versuchsmaterial in 50 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen und die Isolierung der Nucleinsäuren erfolgte nach dem von RICHTER u. SENGER (1964) angegebenen Verfahren. Die Zellen wurden 5 min mit einem Glasperlengemisch (0.35/0.5 mm Ø wie 1/1) unter Zugabe von SDS (Endkonzentration 0.5%) in einer Vibrogen-Zellmühle (Firma E. Bühler, Tübingen) im 200 ml-Einsatz unter Kühlung mit Eiswasser aufgeschlossen. Man erhielt dann 70-80 ml Rohextrakt. Nachdem das Homogenat mit Hilfe einer Fritte von den Glasperlen abgetrennt worden war, konnten 70 ml Tris-puffergesättigtes Phenol zugegeben werden. Das Phenol-Homogenat-Gemisch wurde 5 min geschüttelt. Nach Abzentrifugieren wurde die wässrige Phase abgezogen. Die Phenolphase wurde noch 2 mal mit Tris-Puffer pH 7.5 bzw. 9.0 extrahiert. Die vereinigten wässrigen Überstände wurden mit dem doppelten Volumen Äthanol (98%) versetzt und die Nucleinsäuren bei -18°C ausgefällt.

Modifizierte Methode nach KIRBY (1965): Im Vergleich zur Phenolmethode wurde folgende Extraktionsmethode angewendet: Der Aufschluß der Zellen erfolgte in der oben beschriebenen Weise. Der Rohextrakt wurde nun in 2 Portionen aufgeteilt. Teil 2 wurde mit 50 ml Phenol, das 0.05 g 8-Hydroxychinolin und 6.8 ml m-kresol enthielt, 5 min geschüttelt. Nach Abheben der wässrigen Phase wurden 50 ml Tris-Puffer pH 7.5 mit 6% p-Aminosalicylsäure zur Phenolphase gegeben und ebenfalls 5 min geschüttelt. Der letzte Vorgang wurde wiederholt. Die vereinigten wässrigen Überstände wurden wie Teil 1 mit Äthanol versetzt.

4) Präparation hochmolekularer RNS

Für Zentrifugationsversuche im Saccharosegradienten war es notwendig, reine hochmolekulare RNS zu bekommen. Einengen von MAK-gereinigter RNS mit 30 %iger Dextranlösung lieferte unbefriedigende Ergebnisse bei der Dichtegradientenzentrifugation. Deshalb schien es besser, das von BRAWERMAN u.Mitarb. (1962) vorgeschlagene Verfahren anzuwenden. Die hmRNS ist in NaCl-Lösung schwerer löslich als die niedermolekulare RNS und die DNS und läßt sich deshalb aus einer Lösung der Gesamtnucleinsäuren ausfällen. Die Nucleinsäuren wurden nach der Äthanolfällung 1 mal mit Äthanol gewaschen und in 30 ml Phosphatpuffer pH 6.7 (0.05 m) gelöst. Diese Lösung wurde mit 10% NaCl (w/v) versetzt und über Nacht im Kühlschrank stehen lassen. Das entstandene Sediment wurde bei 18 000 Upm 2 min lang abzentrifugiert, 1 mal mit 10% NaCl-Phosphatpuffer gewaschen und in 0.8-1.0 ml Phosphatpuffer pH 6.7 (0.05 m) aufgenommen. Diese Lösung enthielt nur hmRNS (s.Abb.18) und konnte direkt auf den Saccharosegradienten aufgetragen werden.

5) RNase-Abbau

Zum Nachweis der DNS im Spektrum der Gesamtnucleinsäuren nach Elektrophoreseauftrennung diente ein RNase-Abbau. In TBE-Puffer (s.Abschnitt II,9) gelöste Nucleinsäuren (900 µg/ml) wurden mit 10 µg RNase auf 100 µg Nucleinsäuren 30 min lang bei 37°C inkubiert und anschließend auf 0°C abgekühlt. Das Reaktionsgemisch konnte direkt der Elektrophorese unterworfen werden.

Die RNase war durch Erhitzen in Phosphatpuffer pH 6.7 (0.05 m) auf 80°C für 10 min und schnelles Abkühlen auf 0°C von DNase befreit worden (HAYASHI u.Mitarb. 1965).

6) Chromatographische Trennverfahren

MAK-Säulen

Die extrahierten Nucleinsäuren wurden an Säulen (2.2 x 15.5 cm; Volumen des Säulenbetts ca. 25 cm^3) aus methyliertem Serumalbumin mit Kieselgur als Trägersubstanz aufgetrennt (MANDELL u. HERSHEY 1960). Das methylierte Albumin wurde nach dem von HAYASHI u.Mitarb. (1965) beschriebenen Verfahren hergestellt.

Vor dem Beladen der Säule wurde mit 100 ml Phosphatpuffer pH 6.7 (0.05 m mit 0.1 m NaCl) durchgewaschen. Die beladene Säule wurde mit 50 ml desselben Puffers durchgespült, um kleinmolekulare Bestandteile zu entfernen. Nachdem die Nucleinsäuren vom Äthanol abzentrifugiert und 1 mal mit Äthanol gewaschen waren, wurden sie in 30 ml Phosphatpuffer (0.05 m; pH 6.7; 0.1 m NaCl) gelöst und maximal 2.5 mg auf die MAK-Säule aufgetragen. Die Mengenbestimmung erfolgte durch Vermessen der Extinktion bei 260 nm im Spektralphotometer (MS II, Zeiss): eine Extinktion von 0.1 wurde gleich 20 ug/ml Nucleinsäuren gesetzt. Das Chromatogramm wurde mit Hilfe eines logarithmischen konzentrationsgradienten von 0.1 gegen 1.5 m NaCl in Phosphatpuffer (0.05 m; pH 6.7) entwickelt (RICHTER u.SENGER 1964) und Fraktionen zu 5 ml aufgefangen. Die Extinktion bei 254 nm wurde kontinuierlich im Uvicord (LKB Produkter AB, Schweden) gemessen und auf einem Schreiber aufgezeichnet. Bei ^{32}P-markierten Nucleinsäuren wurde die Radioaktivität in einem Fensterzählrohr (FH 447, Frieseke & Höpfner, Erlangen) in Verbindung mit einem Ratemeter (FH 49 der gleichen Firma) fortlaufend registriert; dabei lief das Eluat, nachdem es die Fotozelle passiert hatte, in einem spiralig aufgerollten Teflonschlauch unter dem Zählrohr durch.

Zur genauen Bestimmung der Kurvenpunkte des Elutionsdiagramms wurde die Extinktion bei 260 nm für die einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Radioaktivität wurde durch Zählen von 0.1 ml-Proben auf Aluminium-Planchetten im Methandurchflußzähler (FH 407, Frieseke & Höpfner) oder auf Filtrierpapierblättchen (Schleicher & Schüll, 2043b, Ø2.7 cm) im Scintillationsspektrometer (Tricarb, Packard) vermessen. Als Scintillationsflüssigkeit diente PPO und POPOP in Toluol.

Bei ^{3}H-markierten Nucleinsäuren konnten die Meßpunkte nur mit Hilfe von Scintillationsmessungen bestimmt werden.

Austauscherchromatographie

Nach Neutralisation mit KOH wurde das Nucleotidgemisch an Dowex (1x2, 200-400 mesh, Cl^-Form) adsorbiert. Die Chromato-

graphie wurde in Säulen (2.3 x 30 cm; Volumen des Säulenbetts 60-70 cm^3) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines zweigeteilten, logarithmischen Gradienten von HCl. Das Vorratsgefäß enthielt bis zur 20.Fraktion 0.05 n HCl; das Mischgefäß (250 ml Erlenmeyer Kolben mit Schliff) enthielt Wasser. Nach Fraktion 20 wurde in das Vorratsgefäß 0.1 n HCl gegeben. Die Registrierung des Elutionsvorgangs erfolgte wie bei der MAK-Chromatographie. Es wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt.

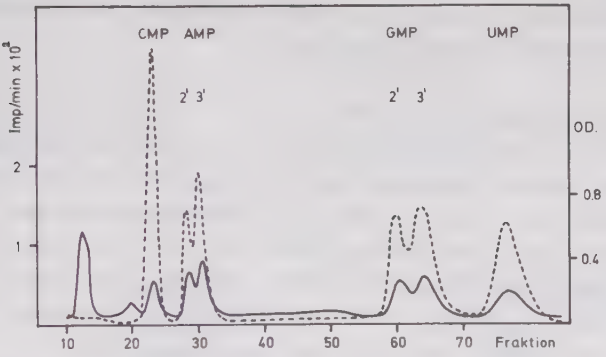


Abb.2: Säulenchromatographische Trennung eines Alkalihydrolysats von 25s RNS (^{32}P-Dauereinbau; 36 h) an Dowex mit Hilfe eines HCl-Gradienten. —— Absorption bei 254 nm, --- ^{32}P-Radioaktivität.

Bei geringen Mengen radioaktiv markierter Nucleinsäuren mußten kleine Säulen (1.2 x 23 cm; Volumen des Säulenbetts 12 cm^3) verwendet werden. In diesem Fall diente ein 50 ml Erlenmeyer Kolben als Mischgefäß. Die Elution erfolgte auf die gleiche Weise wie bei der großen Säule. Die Größe der Fraktionen betrug 2.5 ml.

7) Basenanalysen nach ^{32}P-Markierung

Alkalische Hydrolyse der RNS

Die zu untersuchenden Fraktionen der säulenchromatographischen Auftrennung an MAK wurden vereinigt. Die RNS wurde nach Zugabe von Serumalbumin als Trägersubstanz mit $HClO_4$ (Endkonzentra-

tion 5%) ausgefällt, der Niederschlag abzentrifugiert, in 4 ml 0.5 m KOH aufgenommen und 18 h bei 37°C hydrolysiert. Anschließend wurde das nicht hydrolysierte Material mit 70% $HClO_4$ ausgefällt, der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand neutralisiert. Diese neutrale Lösung wurde auf die Dowex-Säule aufgetragen und eluiert (s.o.).

Auf Grund der Verteilung der ^{32}P-Radioaktivität auf die einzelnen Nucleotide konnte die prozentuale Basenzusammensetzung der RNS ermittelt werden*. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen wurde 1.0 ml jeder Nucleotidprobe auf Planchetten im Methandurchflußzähler gezählt.

Enzymatischer Abbau der DNS

Die Fraktionen der an MAK gereinigten DNS wurden vereinigt und einer alkalischen Hydrolyse unterworfen, um RNS-Verunreinigungen zu entfernen. Aus dem neutralen Hydrolysat konnte die DNS zusammen mit unmarkierter Hefe-DNS bei -18°C in Äthanol ausgefällt werden. Das Präzipitat wurde in Phosphatpuffer (0.05 m; pH 6.7; 0.005 m $MgSO_4$) gelöst und mit 20 ug/ml DNase für 3 h bei 37°C inkubiert. Der pH wurde anschließend mit 0.5 m Tris auf 9.0 eingestellt und 10 ug/ml Phosphodiesterase zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 4.5 h bei 37°C. Nach Neutralisation der Lösung mit $HClO_4$ konnte nach einer hochtourigen Zentrifugation der Überstand auf eine Dowex-Säule aufgetragen werden.

8) Zentrifugationsverfahren

Fraktionierende Zentrifugation von Zellhomogenaten

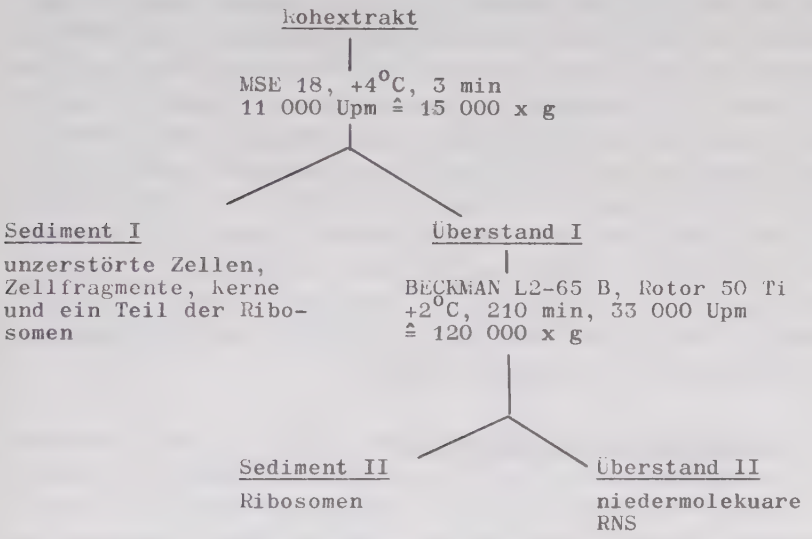
^{32}P-Inkubation und Aufschluß der Zellen erfolgte wie bereits oben beschrieben, allerdings ohne SDS-Zusatz. Zur Verminderung der RNase-Aktivität im Homogenat wurden 0.7 mg/ml gereinigtes Macaloid** (SCHUIT u.BUETOW 1968) zugegeben, der Homo-

---

* Die Umwandlung von CMP nach UMP und Verluste bei CMP, UMP und AMP während der alkalischen Hydrolyse wurden nicht berücksichtigt.

** Das gereinigte Präparat wurde freundlicherweise von Herrn Dr.Mundry, MPI für Biologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

genisator mit Eiswasser gekühlt und die Fritte zum Abtrennen der Glasperlen in Eis eingebettet. Alle weiteren Arbeiten wurden im Eisbad vorgenommen. Die Auftrennung durch Zentrifugation wurde nach folgendem Schema durchgeführt:



Sediment I wurde in Tris-Puffer pH 7.5 mit 0.5% SDS aufgenommen, mit Phenol versetzt und der üblichen Extraktion unterworfen.

Sediment II: Die Partikeln wurden durch vorsichtiges "Plumpern" in Tris·HCl-Puffer pH 7.5 mit 0.5% SDS resuspendiert; danach wurde wie bereits beschrieben mit Phenol deproteinisiert.

Überstand II: Nach Zugabe von SDS (Endkonzentration 0.5%) wurde ebenfalls phenolisiert.

Nach der Äthanolfällung konnten die Nucleinsäuren jeweils an MAK-Säulen aufgetrennt werden.

Gradientenzentrifugation

Zur Auftrennung hochmolekularer RNS diente ein linearer Saccha-

rosegradient* von 5-20% in Phosphatpuffer pH 6.7 (0.05 m). Die in 10% NaCl ausgefällte hmRNS (II,4) wurde in Phosphatpuffer pH 6.7 in Proben zu 0.1-0.2 ml auf den Gradienten gelegt und mit Paraffinöl überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in einer BECKMAN Zentrifuge (L2-65 B) bei 65 000 Upm für 135 min (0^{o}C) im Rotor SW 65K. Nach abgeschlossener Zentrifugation wurde der Boden des Zentrifugenröhrchens angestochen und der Inhalt durch einen Fraktionensammler mit Tropfenformer (LKB Ultrorac) in Fraktionen zu 2 Tropfen aufgeteilt. Die Extinktion bei 260 nm wurde in einer Durchlaufküvette im Spektralphotometer vermessen. Die gesammelten Fraktionen mußten mit 0.5 ml Wasser verdünnt werden, um anschließend die ^{32}P-Radioaktivität durch Scintillationsmessung bestimmen zu können. Durch die räumliche Trennung von Radioaktivitätsmessung und Extinktionsbestimmung tritt eine Verschiebung der Meßkurven um 4 Fraktionen auf; dies konnte durch Eichung der Versuchsapparatur korrigiert werden.

9) Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die angewendete Methode ist als kontinuierliches, elektrophoretisches Trennverfahren an Polyacrylamidgel-Stäben zu bezeichnen. Zunächst wurde geprüft, welche Gelkonzentration für die Fragestellung am besten geeignet ist (III, 7).

Präparation der Gele: Die Reinigung von Acrylamid und Methylenbisacrylamid erfolgte nach den Angaben von LOENING (1968b). Das Polymerisationsgemisch wurde in Plexiglasröhrchen (0.5 x 8.0 cm Innenmaße) gegossen. Bei weichen Gelen mußte ein Plastikring (0.3 cm Ø innen) und ein Pfropf aus 7.1% Acrylamid einpolymerisiert werden, um die Gelsäule (6.5 cm) darüber zu halten. Die Ausbildung eines Meniskus an der erstarrenden Geloberfläche läßt sich durch vorsichtiges Aufschichten von Wasser verhindern. Dieses Wasser wurde nach dem Erstarren des Gels 3 mal gewechselt, um die Oberfläche von monomerem Acryl-

* Saccharose für die Dichtegradientenzentrifugation (E.MERCK, Darmstadt).

amid und Ammoniumpersulfat zu reinigen, ehe der Trennpuffer aufgebracht wurde.

Nachfolgende Tabelle gibt die Zusammensetzung des Polymerisationsgemischs für die verschiedenen Acrylamidkonzentrationen an. Die Konzentrationsangaben der Gele beziehen sich auf Acrylamid. Die Stammlösungen wurden in der Reihenfolge 1-5 gemischt.

1) 19% Acrylamid, 1% Methylenbisacrylamid in H_2O
2) 6.4% Dimethylaminopropionitril
3) 10 fach konzentrierter TBE-Puffer*
4) Aqua bidest.
5) 1.6% Ammoniumpersulfat

Acrylamid-Konzentr. / ml	1	2	3	4	5
7.1	0.375	0.062	0.099	0.402	0.062
4.75	0.250	0.041	0.100	0.567	0.041
2.3	0.120	0.043	0.100	0.700	0.043
2.1	0.110	0.047	0.100	0.710	0.047

Tabelle 2: Gelzusammensetzung; Mengenangaben umgerechnet auf 1 ml Endvolumen.

Einengen der Nucleinsäuren: Für die Elektrophorese waren konzentrierte Nucleinsäurelösungen notwendig. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn man die Gesamtnucleinsäuren nach der Äthanolfällung in 8-10 ml TBE-Puffer löste und über Nacht in 30 %igem Dextran (T70 in TBE-Puffer) das Volumen der Lösung auf ca 2 ml reduzierte.

Auftragen der Nucleinsäuren: Die Lösung wurde mit Bromphenolblau angefärbt, an Saccharose gesättigt und mit einer Kon-

* 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 25 mM Na_2-EDTA, pH 8.3 ohne Justierung (RUPPEL 1968).

striktionspipette dem Trennpuffer unterschichtet. Die Menge pro Gelröhrchen betrug 15-20 µg in 10-30 µl.

Elektrophorese: Als Trennpuffer diente TBE-Puffer pH 8.3. Die Elektrophorese wurde bei +4°C in einer Shandon-Apparatur (Scientific Comp. Ltd., London) durchgeführt. Pro Gelsäule wurde eine Stromstärke von 5 mA gewählt. Die Laufzeit betrug ca 25 min, wobei in den ersten 5 min mit der halben Stromstärke gearbeitet wurde.

Fixieren: Die Gele wurden vorsichtig aus den Plexiglasröhrchen in ein Bad von 1 molarer Essigsäure gedrückt und 20-30 min fixiert.

Färben: Nach Auswaschen mit Na-Acetatpuffer (0.4 m, pH 4.7) wurde mit einer 2 %igen Methylenblaulösung in Na-Acetatpuffer 15 min gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch 24-stündiges Wässern entfernt. Die Bandenverteilung wurde im Chromoscan MK II (Joyce-Loebl, Team Valley, England) registriert. Zum Vergleich wurden ungefärbte Gelstäbe bei 260 nm (Chromoscan im MPI für Biologie, Tübingen) vermessen.

Radioaktivitätsbestimmung: Zur Registrierung des Verteilungsmusters der ^{32}P-Radioaktivität wurden die Gele auf 6.5 cm Länge in einem Schiffchen aus Aluminiumfolie mit kohlensäureschnee eingefroren und mit einem Gelschneider (The Mickle Laboratories, Gomshall, England) in 0.5 mm dicke Scheiben geschnitten, die auf 2 x 2 cm großen Filtrierpapierblättchen getrocknet wurden. Die Aktivität ließ sich durch Scintillationsmessung (PPO-POPOP-Toluol Scintillator) ermitteln.

10) Zahl der Versuche

Im allgemeinen wurden mindestens 3 Versuche mit der gleichen Versuchsanordnung durchgeführt. In einzelnen Fällen waren es erheblich mehr, nämlich 5-8. Die Vorversuche wurden nur 1 mal durchgeführt. Die Darstellungen zeigen repräsentative Beispiele.

11) Chemikalien

Aminosäuren: E.Merck, Darmstadt und Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg
Kinetin und 2,4D: Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg
TES und Vitamine: E.Merck, Darmstadt
^{32}P-Orthophosphat und Uridin-5-T: The Radiochemical Centre, Amersham, England
Dextran T70: Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dowex: Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg
Serumalbumin: Calbiochem, Luzern, Schweiz
Kieselgur (Hyflo-Super Cel): Lehmann u. Voss, Hamburg
Acrylamid und Methylenbisacrylamid: Schuchart, München
Ammoniumpersulfat p.A. und Dimethylaminopropionitril: Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg
RNase, lyophylisiert, phosphatfrei: Worthington Biochem. Comp. USA
DNase, krist., reinst, aus Rinderpankreas: Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg
Phosphodiesterase f. analyt. Zwecke: Boehringer u. Soehne, Mannheim
PPO (2.5-Diphenyloxazol) und POPOP (1.4-bis-(4-Methyl-5-Phenyloxazol)-Benzol): Packard, Frankfurt/Main
Natriumdodecylsulfat: Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg
Alle übrigen Chemikalien stammten von der Firma E.Merck, Darmstadt. Die wässrigen Lösungen wurden mit Aqua bidest. angesetzt.

12) Abkürzungen

D-RNS: DNS-ähnliche RNS; hmRNS: hochmolekulare RNS; nmRNS: niedermolekulare RNS; m-RNS: messenger-RNS; rRNS: ribosomale RNS; SDS: Natriumdodecylsulfat; MAK: methyliertes Albumin + Kieselgur; EDTA: Äthylendiamintetraacetat; AMP: Adenosinmonophosphat; CMP: Cytidinmonophosphat; GMP: Guanosinmonophosphat; UMP: Uridinmonophosphat.

III. ERGEBNISSE

1) Kulturversuche

Gewebekulturen haben für die Untersuchung des Nucleinsäurestoffwechsels höherer Pflanzen den Vorteil, daß mit sterilem Material gearbeitet werden kann, daß definierte Bedingungen bei der Zugabe radioaktiver Vorstufen der Nucleinsäuren herrschen, und daß große Mengen teilungsfähiger Zellen zur Verfügung stehen. Nachteile sind in der geringen genetischen Stabilität zu sehen (MELCHERS 1965). Dies bedeutet, daß nur der physiologische Durchschnitt einer Zellpopulation untersucht werden kann.

Wenn im folgenden von Gewebekulturen gesprochen wird, sind Kallusgewebe auf festen Nährböden gemeint. Der Begriff Zellkulturen bezieht sich auf teilungsfähige Zellen in flüssigem Nährmedium.

Sterilität der Kulturen: Nachdem die Herstellung von Zellkulturen gelungen war, interessierte in erster Linie deren Reinheit. Durch Plattieren auf I,2a Medium (s.II,1) konnte gezeigt werden, daß sich ein einheitlicher Rasen aus Petroselinum-Zellen bildet, der frei von Bakterien- und Pilzkolonien ist. Mit diesem Plattierungstest wurde die Sterilität der Kulturen immer wieder geprüft.

Wachstum: Um den optimalen Zeitraum für Versuche zu ermitteln, mußte zunächst der Wachstumsverlauf einer Zellpopulation in einer Suspensionskultur gemessen werden. Bei 3 Meßverfahren (gepacktes Zellvolumen, Gesamtstickstoff, Trockengewicht) erhält man einen parallelen Verlauf der Wachstumskurven (Abb.3). Die lag-Phase dauert bis zum 4.Tag nach Kulturbeginn. Am 5.Tag beginnen die Zellen sich zu teilen (log-Phase). Am 9.Tag läßt die Teilungsaktivität wieder nach (stationäre Phase). Die stationäre Phase ist außerdem durch eine zunehmende Gelbfärbung der Kultur gekennzeichnet. Aus diesem Verlauf ergibt sich, daß Versuche und Überimpfen in neues Nährmedium am 5.-9.Tag nach Kulturbeginn durchgeführt werden müs-

sen. Die Proportionalität zwischen Gesamtstickstoff und gepacktem Zellvolumen wurde in einem Vorversuch geprüft, sodaß für alle weiteren Routinemessungen die einfachere Hämatokritmethode herangezogen werden konnte.

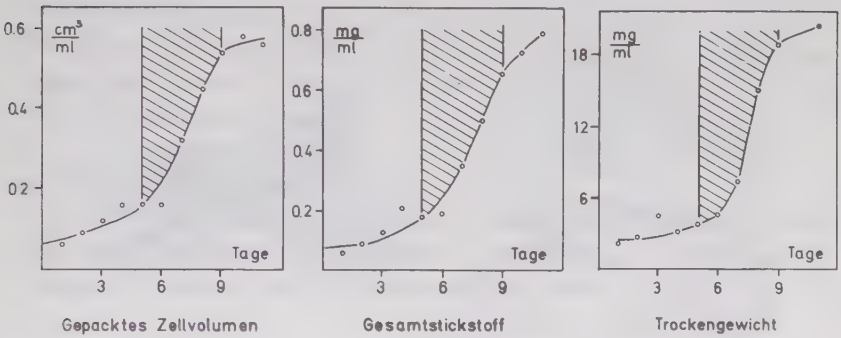


Abb.3: Wachstumsverlauf einer Petroselinum-Zellkultur gemessen an Hand der Zunahme des gepackten Zellvolumens cm^3/ml, des Gesamtstickstoffs mg/ml und der Trockensubstanz mg/ml. Abszisse: Tage nach Kulturbeginn.

Größe der Zellaggregate: Die Zellsuspension setzt sich nicht nur aus Einzelzellen zusammen. Aus Abb.4 läßt sich entnehmen,

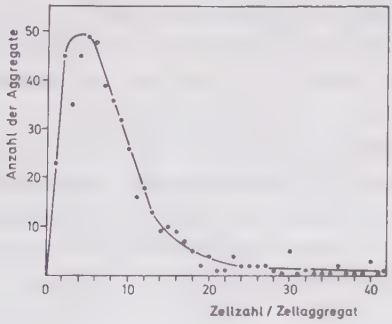


Abb.4: Häufigkeitsverteilung der Zellzahl pro Zellaggregat.

daß Zellklümpchen zwischen 2 und 8 Zellen am häufigsten auftreten und die Häufigkeit größerer Aggregate nach und nach abnimmt.

Mikroskopisches Bild: In Abb.5 ist ein durchschnittlich und ein überdurchschnittlich großer Zellverband fotogarafiert.

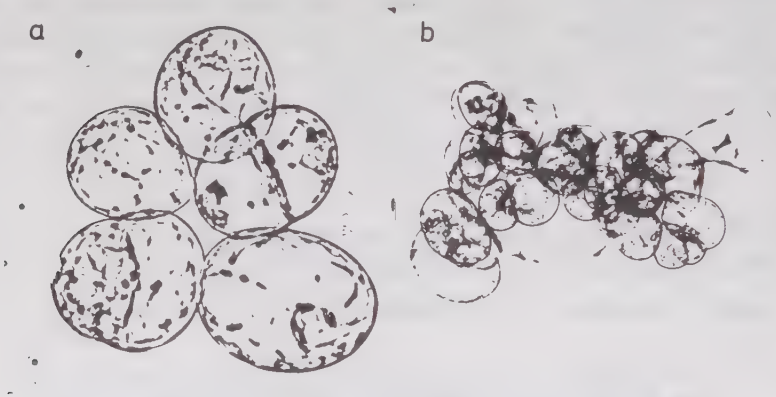


Abb.5: a) durchschnittliches Zellaggregat (Vergr. 2 000 x)
b) überdurchschnittlich großes Zellaggregat von 21 Zellen (Vergr. 1 000 x)*.

Das Wachstum der gesamten Kultur geht wahrscheinlich folgendermaßen vor sich: 1) Die Zellzahl der einzelnen Zellkolonien nimmt zu. 2) Die Zellen kugeln sich ab (dünne Zellwand). 3) Zellen oder kleine Zellklümpchen fallen ab und bilden eine neue Kolonie. Bei Zellen einer solchen Suspensionskultur handelt es sich um embryonale Zellen, die allerdings stark vakuolisiert sind. Der Zellkern mit großen Nucleoli ist an Plasmafäden (Plasmaströmung) in einer Plasmatasche aufgehängt. Chloroplasten sind unter Dauerdunkelbedingungen nicht zu sehen; am Ende der log-Phase nimmt die Stärkebildung stark zu (Amyloplasten). In der stationären Phase des Wachstums steigt die Häufigkeit langer Zellschläuche mit großer Vakuole.

---

* eine 4fache fotographische Vergrößerung ist eingerechnet.

2) Markierungsversuche mit radioaktiven Vorstufen der RNS

Für die Untersuchung schnellmarkierter RNS müssen den Organismen möglichst kurze Zeit radioaktive Vorstufen geboten werden. Als "tracer" standen folgende Substanzen zur Wahl: 1) ^{3}H-Orotsäure, 2) ^{3}H-Uridin, 3) ^{32}P-Orthophosphat. In der vorliegenden Arbeit wurde ^{32}P-Orthophosphat bevorzugt, da unter diesen Bedingungen der prozentuale Anteil der einzelnen Nucleotide einer Nucleinsäurekomponente am leichtesten ermittelt werden kann. Die Markierung mit ^{3}H-Uridin wurde nur zur Ergänzung durchgeführt.

a) ^{32}P-Orthophosphat

Um gute Einbauraten zu erhalten, wurden verschiedene Parameter geprüft. Die Ergebnisse dieser Versuche bei 1-stündiger Inkubation sind in Abb.6a-c zusammengestellt.

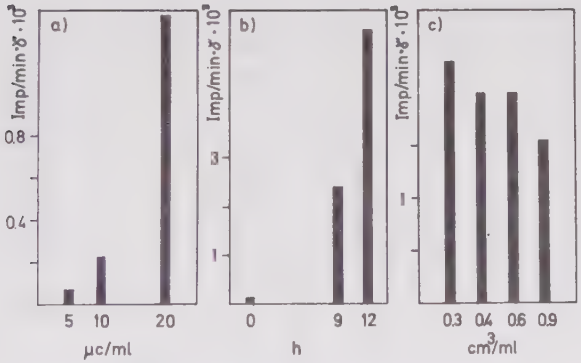


Abb.6: Vorversuche für die Einbaubedingungen bei 1-stündiger Inkubation mit ^{32}P-Orthophosphat.
a) Abhängigkeit des Einbaus (rel. spezifische Aktivität der hmRNS; Imp/min x γ) von der eingesetzten ^{32}P-Orthophosphatmenge.
b) Abhängigkeit des Einbaus (rel. spezifische Aktivität der hmRNS; Imp/min x γ) von der Vorinkubationszeit im phosphatfreien Medium.
c) Abhängigkeit des Einbaus (rel. spezifische Aktivität der hmRNS; Imp/min x γ) von der Kulturdichte (als gepacktes Zellvolumen cm^3/ml).

Es zeigt sich: a) Je mehr radioaktiver Phosphor geboten wird, desto mehr wird eingebaut. b) Die fixierte Aktivitätsmenge hängt stark von der vorhergegangenen Vorinkubationszeit im phosphatfreien Medium ab. Bei 12 h Vorinkubation erhält man eine gute Markierung; bei längerem Aufenthalt in phosphatfreiem Medium kann unter Umständen schon ein Abbau der hochmolekularen RNS festgestellt werden. c) Mit zunehmender Zelldichte bauen die Zellen weniger radioaktives Material ein. Aus diesen Versuchen ergeben sich die Bedingungen für Kurzzeitmarkierungsexperimente: 12 h Vorinkubation, 0.35 cm^3/ml Kulturdichte und 20 µc/ml ^{32}P-Orthophosphat.

1-stündiger Einbau: Bei 1-stündigem ^{32}P-Angebot und anschließender Trennung der Nucleinsäuren an methyliertem Serumalbumin + Kieselgur erhält man das in Abb.7 dargestellte Verteilungsmuster.

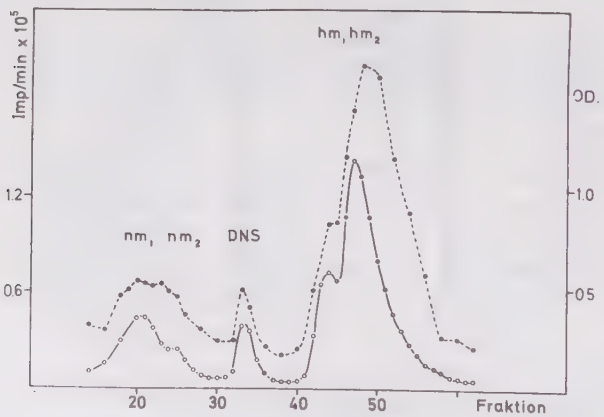


Abb.7: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 1 h. o—o Absorption bei 260 nm (O.D.) •- -• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

a) Das UV-Profil: Mit steigender NaCl-Konzentration werden eluiert:

1) Zwei schlecht voneinander getrennte Komponenten der niedermolekularen RNS (nm_1 und nm_2), die als 4s und 5s RNS in der Literatur beschrieben werden.
2) Nach einer großen Lücke die DNS.
3) Gut abgetrennt von der DNS die hochmolekulare RNS, bestehend aus 2 voneinander schlecht getrennten Komponenten, die als 18s und 25s RNS (hm_1 und hm_2) gekennzeichnet werden.

b) Das Radioaktivitätsprofil verläuft bis auf den Bereich der hochmolekularen RNS, wo eine schwache Verschiebung des Aktivitätsgipfels nach hinten auftritt, nahezu mit dem UV-Profil parallel. Dies bedeutet, daß hier mindestens eine weitere Komponente vermutet werden muß.

30 min-Einbau: Dieses Phänomen wird beim 30 min-Einbau (Abb.8) verstärkt. Die Verschiebung beträgt dann 3-4 Fraktionen.

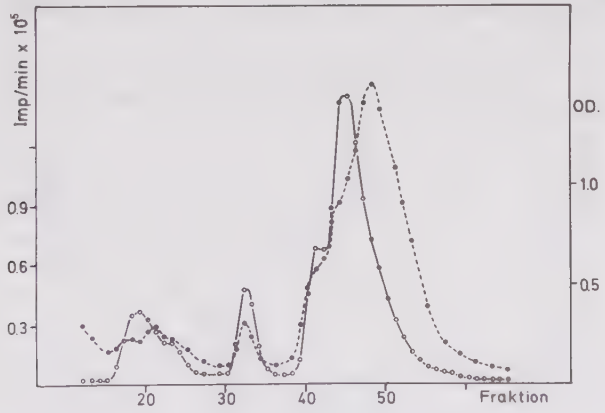


Abb.8: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 30 min. o—o Absorption bei 260 nm (O.D.) •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

Außerdem tritt zwischen 4s und 5s RNS ein Radioaktivitätsgipfel auf, den man ebenfalls als schnellmarkierte Komponente

ansprechen kann, der aber wegen seiner geringen Gesamtaktivität aus den weiteren Untersuchungen ausgeklammert wurde. In der DNS-Region ist verhältnismäßig wenig ^{32}P-Orthophosphat inkorporiert worden. UV- und Radioaktivitätsprofil verlaufen hier koinzidierend. Diese Aktivität muß nicht unbedingt eine Neusynthese von DNS voraussetzen, sie kann auch als Reparatureinbau oder als Markierung des RNS-Anteils gedeutet werden, da der DNS-Bereich 19.2% alkalisch hydrolysierbares Material enthält.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach 1-stündigem ^{32}P-Angebot eine spezifisch hochmarkierte RNS auftritt, die bei höherer NaCl-Molarität als die 25s RNS eluiert wird. Bei 30 min Inkubation tritt diese Komponente noch deutlicher hervor, da nach dieser Zeit die 18s und 25s RNS noch nicht so hoch markiert sind. Die Abtrennung auf MAK ist sehr unvollständig.

Dauereinbau (36 h): Im Vergleich zu der kurzfristigen Mar-

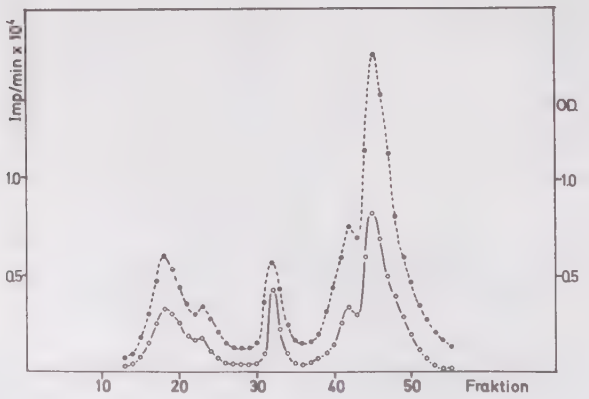


Abb.9: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren nach 2-stündiger Vorinkubation der Zellen in phosphatfreiem Medium und 36-stündiger Inkubation mit ^{32}P-Orthophosphat (10 µc/ml). o—o Absorption bei 260 nm (O.D.) •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

kierung war bei Dauereinbauversuchen eine vollständige Übereinstimmung der beiden Meßkurven zu verzeichnen. Dies ist so zu deuten, daß die Synthese der beiden hochmolekularen RNS-Komponenten inzwischen so stark ist, daß die schnellmarkierte RNS überdeckt wird und nicht mehr im Elutionsprofil zu erkennen ist. Anders formuliert: es besteht ein Zeitunterschied in der Synthese der spezifisch hochmarkierten Fraktion und der hochmolekularen RNS.

"Pulse"-Experimente: In dieser Versuchsserie sollte die Inkubationszeit soweit verkürzt werden, daß nur noch die schnellmarkierte Komponente erfaßt wird und die anderen Nucleinsäurefraktionen noch keine Neusynthese zeigen.

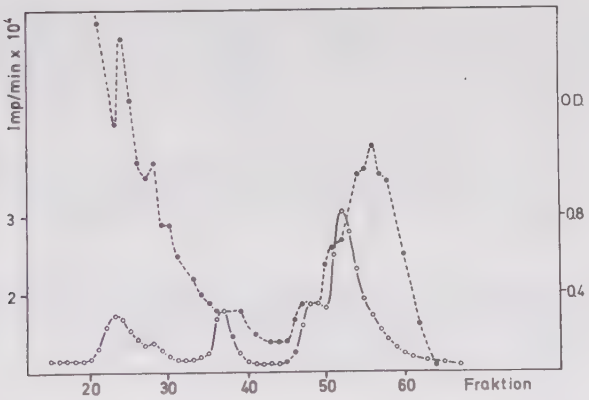


Abb.10: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 15 min.o—o Absorption bei 260 nm (O.D.)●– –●^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

Bei 15 min Inkubationszeit erhält man ein Bild, das dem Elutionsprofil nach 30 min ^{32}P-Angebot weitgehend entspricht (Abb. 10). Hier läßt sich außerdem zeigen, daß bei niedriger NaCl-Konzentration hohe Aktivität auf dem MAK-Chromatogramm erscheint, wenn die Säule nicht wie üblich nach dem Beladen

mit 50 ml 0.1 m NaCl in Phosphatpuffer pH 6.7 gewaschen wird. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Polyphosphate (BEIDERBECK 1968). Diese hohe Markierung tritt nur bei kurzen Einbauzeiten (5-30 min), nicht aber bei Dauereinbauversuchen auf.

Nach einer Inkubationszeit von 10 min ist eine selektive Markierung der gesuchten RNS-Komponente erreicht (Abb.11).

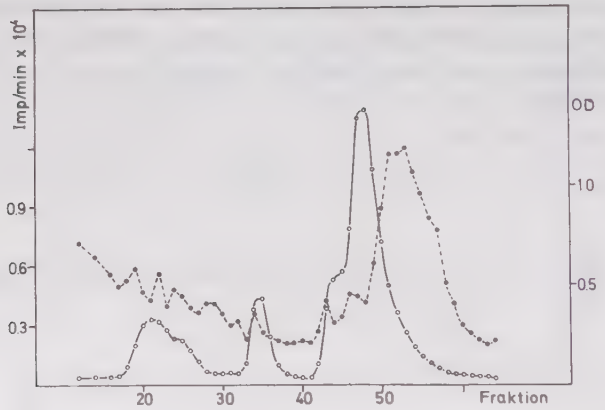


Abb.11: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 10 min. o—o Absorption bei 260 nm (O.D.) •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

Bei einem ^{32}P-Angebot von 5 min (Abb.12) tritt keine wesentliche Verbesserung in dieser Hinsicht ein, man hat aber den Nachteil einer geringeren Gesamtaktivität, sodaß für weitere Versuche eine 10-minütige Inkubation günstig erschien.

Bei diesen "Pulse"-Experimenten läßt sich außerdem zeigen, daß diese hinter der hm_2RNS eluierte Komponente auf MAK nicht einheitlich ist, denn die absteigende Flanke zeigt eine Schulter im Aktivitätsprofil.

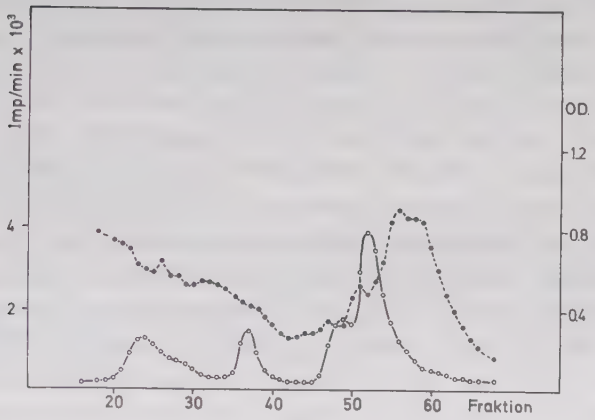


Abb.12: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 5 min. o—o Absorption bei 260 nm (O.D.) •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

Extrahierbarkeit der schnellmarkierten Fraktion: Bei KIRBY (1965) wird angegeben, daß bei Säugetierzellen eine bessere

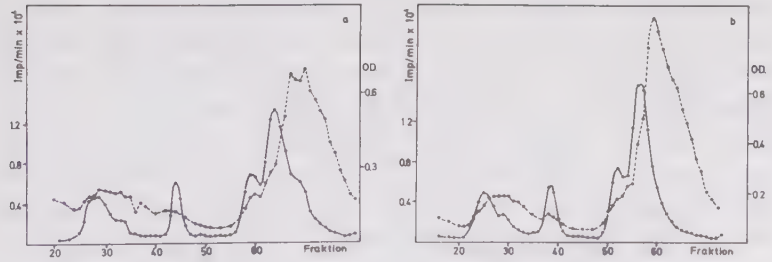


Abb.13: Vergleich der MAK-Elutionsprofile bei verschiedenen Extraktionsverfahren: a) Phenolmethode, b) Phenol-Kresol-p-Aminosalicylsäure-Methode (KIRBY 1965). MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 30 min. o—o Absorption bei 260 nm (O.D.) •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

Ausbeute an schnellmarkierter RNS erzielt wird, wenn an Stelle von Phenol ein Phenol-Kresol-Gemisch zur Deproteinisierung verwendet und wenn mit p-Aminosalicylsäure extrahiert wird. Deshalb wurde der gleiche Ansatz (12 h P-frei, 30 min ^{32}P-Orthophosphat) nach dem Aufschluß geteilt und wie unter Material und Methoden (II,3) beschrieben behandelt. Aus Abb.13 a) und b) geht hervor, daß hier keine wesentliche Verbesserung in der Ausbeute erreicht wird, und daß sich die Elutionsprofile qualitativ kaum unterscheiden, sodaß für alle Versuche das Phenolverfahren angewendet werden konnte. Der Vergleich der relativen spezifischen Aktivität ergibt im Bereich der schnellmarkierten RNS: 5.4 x 10^4 Imp/min x µg für die Phenolmethode und 7.3 x 10^4 Imp/min x µg für die KIRBY-Methode.

b) ^{3}H-Uridin

Als Ergänzung zu den ^{32}P-"Pulse"-Experimenten wurde ein ^{3}H-Uridin-Einbau für 15 min durchgeführt. Dabei erhält man ein

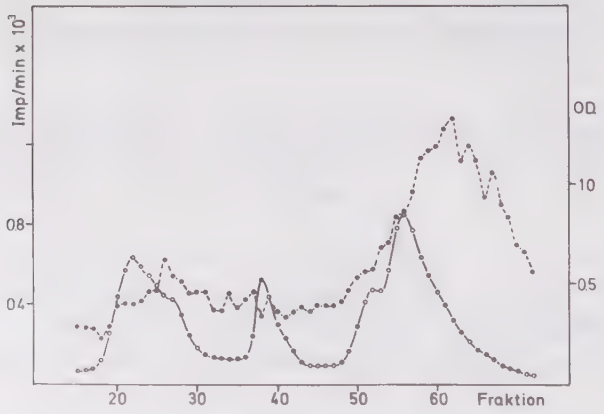


Abb.14: MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren nach Inkubation der Zellen mit ^{3}H-Uridin (3 µc/ml) für 15 min. o—o Absorption bei 260 nm (O.D.) ●--●^{3}H-Radioaktivität (Imp/min).

sehr ähnliches Bild wie bei kurzem ^{32}P-Angebot (Abb.14). Die Auftrennung der Aktivitätsgipfel ist allerdings weniger gut. Auf diesem Elutionsdiagramm ist außerdem die spezifisch hochmarkierte Komponente zwischen nm_1 und nm_2RNS gut zu sehen.

3) "Chase"-Experimente

Bei "Chase"-Experimenten werden die Zellen nach einer Inkubation mit radioaktiven Vorstufen in das Normalmedium, das keine radioaktiven Isotope enthält, überführt und weiterkultiviert. Mit dieser Technik lassen sich Aussagen über die Lebensdauer bestimmter Komponenten machen. In unserem Fall sollte geprüft werden, nach welcher Zeit das in einem Kurzzeitmarkierungsexperiment eingebaute ^{32}P-Orthophosphat durch ^{31}P-Phosphat ersetzt ist. Zu diesem Zweck wurden Zellen 30 min in ^{32}P-haltigem Medium inkubiert und dann in "kaltes Medium" überführt und nach bestimmten Abständen die Nucleinsäuren extrahiert, um sie dann an MAK-Säulen aufzutrennen. Die Übertragung vom Inkubationsmedium in "Chase"-Bedingungen geschah durch Filtrieren und Waschen auf Vliesline. In Abb.15 ist das Ergebnis des Versuchs zusammengestellt. Die Verschiebung von Radioaktivitäts- und UV-Gipfel wird bei Verlängerung der "Chase"-Behandlung rückgängig gemacht; nach 4-stündigem "Chase" ist die schnellmarkierte Komponente nicht mehr zu erkennen. Man kann nun daraus auf eine Lebensdauer von ca 4 h schließen. Diese Größenordung scheint möglich; WOLLGIEHN u. RUESS (1968) kalkulieren bei Tabakblättern eine Halbwertszeit der entsprechenden Komponente von 3.5-4 h. Einschränkend muß zu diesen Versuchen gesagt werden, daß die Radioaktivität der hm_1 und hm_2RNS während der "Chase"-Behandlung zunimmt. Dafür bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an: 1) Aus einem ^{32}P-Nucleotid-"pool" oder aus Phosphatreserven wird weiterhin markierte RNS synthetisiert (WOLLGIEHN u.RUESS 1968); oder 2) die schnell synthetisierte RNS ist eine Vorstufe der hm_1 und hm_2RNS und liefert durch Umbau die zusätzliche Aktivität in diesen Fraktionen; eventuell überlagern sich auch beide Vorgänge.

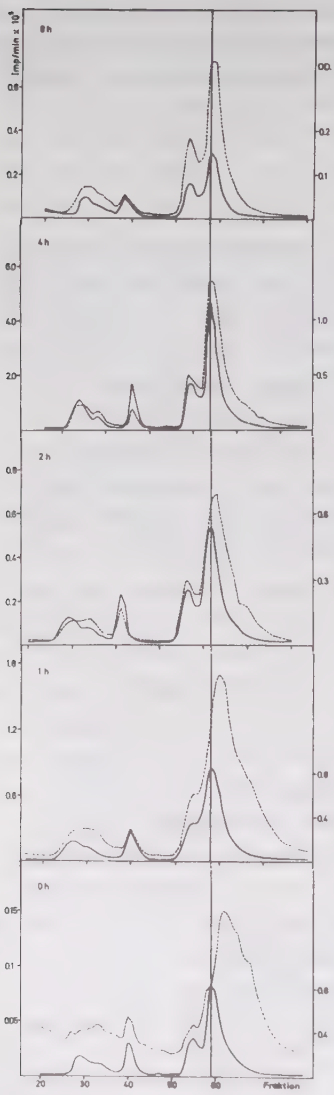


Abb.15:
"Chase"-Experiment; MAK-Trennung der Gesamtnucleinsäuren nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 30 min und anschließender "Chase"-Behandlung (^{31}P) von 0, 1, 2, 4 und 8 h. —— Absorption bei 260 nm (O.D.) ---- ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

4) Fraktionierende Zentrifugation von Zellhomogenaten

Als nächstes wurde gefragt, ob ob die gesuchte RNS-Komponente an irgendwelche Zellpartikeln gebunden ist. Als einfache Methode bietet sich hier die fraktionierende Zentrifugation des Homogenats an. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt: Sediment I (s.II,8) enthält außer ganzen, unzerstörten Zellen, Zellfragmenten, Zellkernen, wahrscheinlich auch noch verklumpte Ribosomen. Bei MAK-Chromatographie erscheint demnach das gesamte Nucleinsäurenspektrum. In Sediment II finden sich die grob gereinigten Ribosomen, sodaß auf dem Eluierungsdiagramm die beiden hochmolekularen RNS-Komponenten (hm_1 und hm_2) erscheinen; man bezeichnet sich deshalb auch als ribosomale RNS (rRNS). Außerdem tritt die nm_2RNS (5s) auf, die nach MARCOT-QUEIROZ u.Mitarb. (1965) ebenfalls eine ribosomale

Komponente darstellt. Die schnellmarkierte RNS wird ebenfalls eluiert. Die Kerne und damit auch die DNS wurden zum größten Teil bei der ersten Zentrifugation abgetrennt. Durch dieses Verfahren läßt sich zumindest zeigen, daß die schnellmarkierte RNS mit den Ribosomen abzentrifugiert werden kann (Abb.16). Der Überstand II enthält die niedermolekulare RNS (4s RNS).

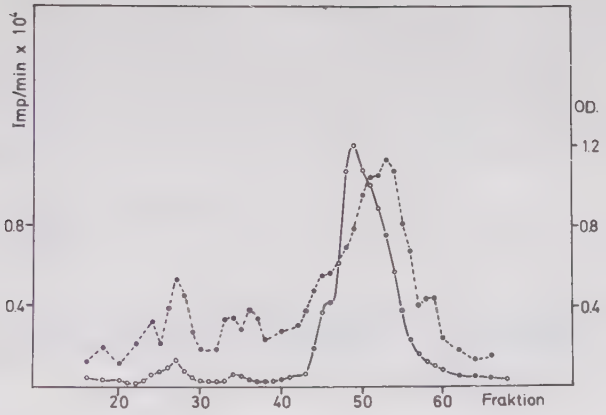


Abb.16: MAK-Trennung der Nucleinsäuren von Sediment II (Ribosomensediment) nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 30 min. o—o Absorption bei 260 nm (O.D.) •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

Im Bereich der hochmolekularen RNS tritt kein Aktivitätsgipfel auf. Dies bedeutet, daß die spezifisch hochmarkierte RNS keine frei im Cytoplasma vorkommende Komponente darstellt (Abb.17). Es wurde außerdem im Hinblick auf messenger-RNS und Polysomen versucht, durch Homogenisation und Zentrifugation im Mg-freien Puffer und durch Zugabe von Na_2-EDTA als Komplexbildner nach dem Zellaufschluß die hochmarkierte RNS-Fraktion von den Ribosomen abzulösen und im Überstand II als Radioaktivitätsgipfel wiederzufinden. Dies ist trotz zahlreicher Experimente und Vorsichtsmaßnahmen gegen RNase-Aktivität nicht gelungen.

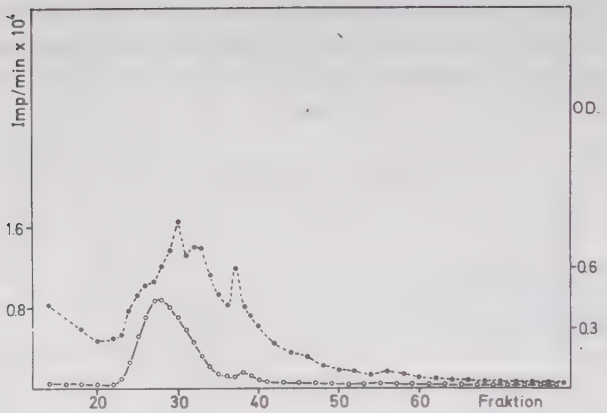


Abb.17: MAK-Trennung der Nucleinsäuren von Überstand II nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 30 min. o—o Absorption bei 260 nm (O.D.) •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

5) Basenzusammensetzung

Zur Charakterisierung der schnellmarkierten RNS kann die Nucleotidzusammensetzung herangezogen werden. Es ist möglich, die prozentuale Verteilung durch Messung der Einbauquoten von ^{32}P-Orthophosphat in die Nucleotide zu errechnen. Als Voraussetzung für diese Methode muß eine gleichmäßige Inkorporation des radioaktiven Phosphors in die vier Nucleotide angenommen werden.

RNS: Es schien sinnvoll, die Basenzusammensetzung der absteigenden Flanke des Radioaktivitätsgipfels einer MAK-Trennung bei Kurzzeitmarkierung (30 min) und Dauereinbau (36 h) zu vergleichen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Es lassen sich deutliche Unterschiede in der Basenzusammensetzung ablesen. Die schnellmarkierte Fraktion enthält sehr viel AMP (30%). Bei Dauereinbau findet man dage-

gen einen hohen GMP-Gehalt (30%). Vergleicht man damit die aufsteigende Flanke der hm_2RNS, zeigt sich, daß die Basenzusammensetzung nach Dauereinbau am ehesten dem ribosomalen Typ der hm_2RNS entspricht. HEMLEBEN-VIELHABEN (1966) gibt für die hm_2RNS von Phaseolus-Wurzeln (30 min Inkubation mit ^{32}P-Orthophosphat) 23.0/27.6/30.1/19.3 für CMP/AMP/GMP/UMP an. In allen von uns untersuchten Fraktionen ist UMP am geringsten vertreten. Auch nach fraktionierender Zentrifugation findet man im Ribosomensediment (s.Abschnitt II,8) eine schnellmarkierte RNS, deren AMP-Anteil noch höher ist (37.1%). Andere Autoren haben bei höheren Pflanzen ähnliche Verhältnisse gefunden. INGLE u.KEY (1965) bezeichnen diese RNS wegen ihrer Ähnlichkeit mit der DNS als D-RNA (DNA-like RNA). EWING und

	%			
	CMP	AMP	GMP	U(T)MP
Kurzzeit 30′	23.5 ±1.5	30.0 ±1.1	26.2 ±1.9	20.5 ±0.9
Langzeit 36h	25.5 ±2.1	25.6 ±0.8	30.0 ±0.9	18.9 ±0.9
Kurzzeit 30′	22.4	27.2	28.2	22.2
Langzeit 36h	19.3	33.0	17.9	29.8

Tabelle 3: Basenzusammensetzung der Nucleinsäurekomponenten (in%) ermittelt nach Markierung der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat und Auftrennung der Gesamtnucleinsäuren an MAK. Die untersuchten Fraktionen sind auf den Schemata schwarz markiert. —— UV-Absorption ····· ^{32}P-Radioaktivität. Klein geschriebene Zahlen geben die Standardabweichung an.

CHERRY (1968) sprechen von"AMP-rich RNA". WOLLGIEHN u.RUESS (1968) finden neben hohem AMP-Gehalt einen hohen UMP-Anteil und bezeichnen die ebenfalls bei hoher Kochsalzmolarität eluierte RNS als AU-RNS. Auf Grund der Bindung an Polysomen schlagen LIN u.Mitarb. (1966) vor, daß zumindest ein Teil dieser Komponente messenger-RNS darstellt.

DNS: Wenn es sich bei der fraglichen Fraktion um messenger-RNS handelt, könnte man annehmen, daß sie als primäres Genprodukt ähnlich zusammengesetzt ist wie die DNS - allerdings nur unter der Voraussetzung, daß große Stücke der DNS transcribiert werden. Aus diesem Grunde wurde durch enzymatischen Abbau die Nucleotidzusammensetzung der DNS von Petroselinum nach Dauereinbau bestimmt (Tabelle 3). Nach diesen Ergebnissen (29.8% TMP) läßt sich der hohe AMP-Gehalt (30.0%) der schnellmarkierten RNS gut erklären. Der geringe UMP-Gehalt (20.5%) hat in der DNS (33.0% AMP) kein Gegenstück.

6) Dichtegradientenzentrifugation

Bei Fraktionierung durch methyliertes Serumalbumin mit Kieselgur als Trägersubstanz spielen mindestens zwei Eigenschaften der Nucleinsäuren eine Rolle: 1) die Basenzusammensetzung, 2) das Molekulargewicht. Je mehr Adenin und Uracil die Nucleinsäuren enthalten, desto höhere Salzkonzentrationen sind notwendig, um die Substanz von der Säule zu eluieren. Die schlechte Auftrennung im Bereich der hochmolekularen RNS ist eine Folge der Überschneidung der beiden genannten Phänomene. Aus diesem Grunde lassen sich nach den Elutionsprofilen von MAK keine Angaben über Molekulargewicht und Molekülgröße machen. Es war deshalb notwendig, Methoden, die nach der Molekülgröße trennen, wie Gelfiltration, Dichtegradientenzentrifugation oder Gelelektrophorese, anzuwenden.

Auf Sepharose 2B ließ sich die schnellmarkierte RNS von der rRNS nicht abtrennen. Für die Fraktionierung im Saccharose-

---

* Sepharose 2B der Firma Pharamcia, Uppsala, Schweden.

gradienten war es notwendig, die hochmolekulare RNS vorzureinigen; wenn man die Gesamtnucleinsäuren nach Kurzzeitmarkierung aufträgt, verschmiert eine hohe Radioaktivität aus niedermolekularen Bestandteilen das Aktivitätsprofil im Bereich der hochmolekularen RNS. Einengen gegen Dextran T70 dauerte zu lange; die Nucleinsäuren waren danach z.T. bereits geschädigt. Als günstigstes Verfahren bot sich Ausfällen der hochmolekularen RNS durch 10% NaCl an. In Abb.18 ist ein MAK-Chromatogramm einer hmRNS wiedergegeben, die auf diese Weise gereinigt wurde. Bei Kurzzeitmarkierung wird die schnellmarkierte RNS ebenfalls durch NaCl ausgefällt.

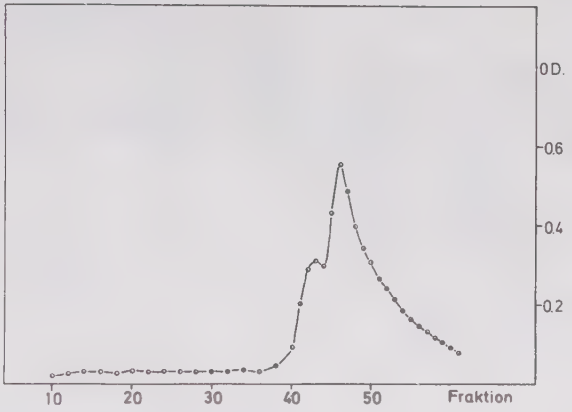


Abb.18: MAK-Trennung der hmRNS, die durch 10% NaCl in Phosphatpuffer (0.05 m, pH 6.7) aus den Gesamtnucleinsäuren ausgefällt worden war. o — o Absorption bei 260 nm.

Dauereinbauversuch (36 h) mit ^{32}P-Orthophosphat: Die Auftrennung im Saccharosegradienten (5-20%) ist in Abb.19 dargestellt. Die schweren Ribonucleinsäuren erscheinen links im Bild (Boden des Zentrifugenröhrchens), die leichteren rechts, nahe dem Meniskus. Bei Fraktion 20 befindet sich die hm_2RNS, bei Fraktion 30 die hm_1RNS. ^{32}P-Radioaktivitätskurve und UV-Profil verlaufen parallel.

10 min Einbauversuch mit ^{32}P-Orthophosphat: Abb.20 zeigt ein "Pulse"-Experiment mit selektiv schnellmarkierter RNS. Nahe dem Boden des Zentrifugenröhrchens ist ein Gipfel hoher spezifischer Aktivität (Fraktion 10) zu beobachten, der im Bereich der hochmolekularen RNS praktisch die einzige Markierung darstellt. Der steile Anstieg der Aktivitätskurve nahe dem Meniskus ist auf unvollständige Entfernung der kleinmolekularen Bestandteile zurückzuführen. An diesem Experiment

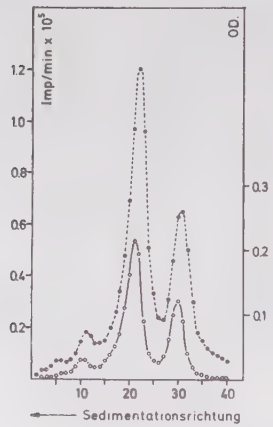


Abb.19:
Auftrennung der hmRNS im Saccharosegradienten (5-20%) nach 2-stündiger Vorinkubation der Zellen im phosphatfreien Medium und 36-stündiger Inkubation mit ^{32}P-Orthophosphat (10 µc/ml). BECKMAN Zentrifuge L2-65B; 65 000 Upm für 135 min, 0°C; Rotor SW 65K.
o—o Absorption bei 260 nm (O.D.)
•--• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

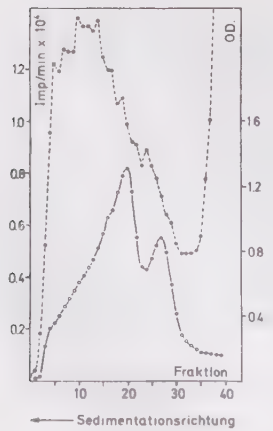


Abb.20:
Auftrennung der hmRNS im Saccharosegradienten (5-20%) nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 10 min. Zentrifugationsbedingungen wie in Abb.19.
o—o Absorption bei 260 nm (O.D.)
•--• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

läßt sich zeigen, daß die selektiv schnellmarkierte RNS eindeutig einen höheren Sedimentationskoeffizienten als die hm_2-RNS hat. Der kleine Gipfel bei Fraktion 10 im Dauereinbauversuch (Abb.19) ist mit großer Wahrscheinlichkeit dieser Komponente gleichzusetzen.

30 min Einbau mit ^{32}P-Orthophosphat: Verlängert man die Inkubationszeit auf 30 min, so erhält man die in Abb.21 gezeigten Verhältnisse. Die schwere, schnell synthetisierte Komponente tritt ebenfalls auf; außerdem finden wir im Bereich der Fraktion 5 einen weiteren Gipfel, der sich allerdings nicht immer reproduzieren läßt.

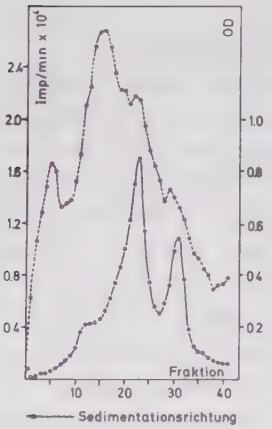


Abb.21:
Auftrennung der hmRNS im Saccharosegradienten (5-20%) nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 30 min. Zentrifugationsbedingungen wie in Abb.19.
o—o Absorption bei 260 nm (O.D.)
•– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

Unterwirft man die schnellmarkierte Komponente einer alkalischen Hydrolyse und bestimmt die Basenzusammensetzung, so erhält man die in Tabelle 4 zusammengestellte, prozentuale Verteilung der Nucleotide. Die Werte unterscheiden sich von jenen, die bei Reinigung der AMP-reichen RNS an MAK erhalten werden. Es besteht eine Tendenz zu einer ribosomalen Basenzusammensetzung.

	%			
	CMP	AMP	GMP	UMP
Kurzzeit (Saccharose-gradient)	16.7	28.4	30.0	24.8

Tabelle 4: Basenzusammensetzung der schnellmarkierten RNS (in %) ermittelt nach Kurzzeitmarkierung der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat und Auftrennung der hm-RNS im Saccharosegradienten. Die untersuchten Fraktionen sind auf dem Schema schwarz markiert. —— UV-Absorption ..... ^{32}P-Radioaktivität.

7) Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese

HAYES u.Mitarb. (1966) haben gezeigt, daß schnellmarkierte Bakterien-RNS in Anwesenheit von 0.6 Mol Alkaliionen, bei einem pH unter 9.5 und einer Temperatur unter 15°C Komplexe mit der ribosomalen RNS bildet. Derartige Bedingungen treten beim Auftrennen der Nucleinsäuren an MAK auf. Es war deshalb notwendig, zum Vergleich mit den bisherigen Trennverfahren eine Methode ohne Kochsalzzusatz einzuführen. Hierfür bietet sich die Elektrophorese an Polyacrylamidgel-Stäben an. Diese Methode hat den weiteren Vorteil, daß sich Aussagen über Größe und Molekulargewicht machen lassen. Bei allen bisher angeführten Verfahren wurde der hohe AMP-Gehalt der schnellmarkierten RNS zur Identifizierung herangezogen. Für die Kennzeichnung nach elektrophoretischer Auftrennung stand nur die selektive Markierung nach 10 min ^{32}P-Angebot zur Verfügung.

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese trennt im wesentlichen nach dem Molekulargewicht der Nucleinsäuren. Es war zunächst wichtig, die günstigste Gelkonzentration für die Auftrennung der RNS im hochmolekularen Bereich zu ermitteln. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Abb.22 zusammengestellt.

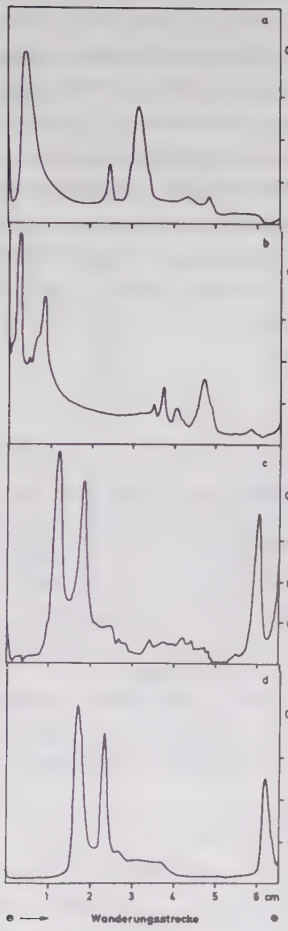


Abb.22:
Elektrophorese der Gesamtnucleinsäuren bei verschiedenen Gelkonzentrationen. a) 7.1%, b) 4.75%, c) 2.3%, d) 2.1% Acrylamid. Laufzeit: 25 min; 5 mA/Gel; TBE-Puffer pH 8.3.

Bei hoher Acrylamidkonzentration (7.1%) dringt die hochmolekulare RNS gerade eben ein, die niedermolekulare dagegen wird sehr gut in zwei Komponenten aufgetrennt, die nach LOENING (1967) als 4s und 4s-RNS identifiziert wurden. Wird die Acrylamidkonzentration weiter verringert (4.75%), dringt die hmRNS weiter ein und wird schon in die beiden Hauptkomponenten 25s und 18s RNS aufgelöst. Bei 2.3% Acrylamid ist die Trennung von hm_1RNS und hm_2RNS gut. Verringert man die Gelkonzentration weiter (2.1%), so werden die beiden ribosomalen Komponenten weiter voneinander getrennt, außerdem dringen sie insgesamt tiefer in das Gel ein. Da bei der Zentrifugation im Dichtegradienten gezeigt werden konnte, daß die schnellmarkierte RNS schwerer als die 25s RNS ist, mußte diese Acrylamidkonzentration für weitere Versuche verwendet werden. Noch weichere Gele als 2.1% Acrylamid sind sehr schwer zu handhaben.

Bisher wurde nichts über das Verbleiben der DNS ausgesagt. Bei Färbung mit 2%iger Methylenblaulösung tritt zwischen den

beiden hochmolekularen, tiefblau gefärbten RNS-Komponenten eine schwach violett erscheinende Bande auf, die sich nach längerem Wässern als erste entfärbt. Die Vermutung, daß es sich hierbei um DNS handeln könnte, läßt sich durch RNase-Abbau erhärten (Abb.23a) und b). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Angaben von LOENING u.INGLE (1967). Diese Autoren geben an, daß DNS schlechter als die hochmolekulare RNS in Polyacrylamidgele eindringt. RUPPEL (1968) findet dagegen eine ähnliche Lage der DNS wie wir. Die Unterschiede sind sicher auf die Präparation der Nucleinsäuren zurückzuführen; da aber die DNS für die Problemstellung nicht wichtig war, wurde dieser Frage nicht weiter nachgegangen.

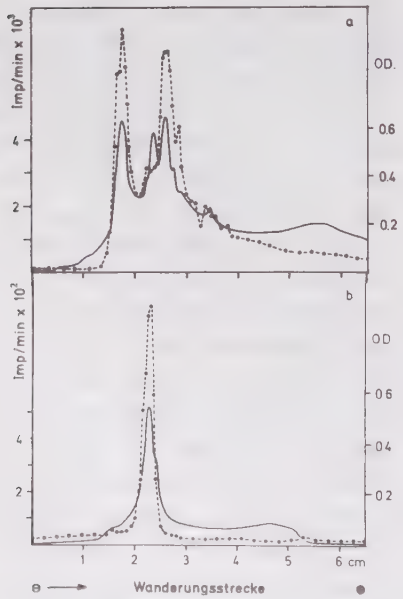


Abb.23:
Bestimmung der Lage der DNS im Spektrum der Gesamtnucleinsäuren bei Elektrophorese mit Hilfe eines RNase-Abbaus. Elektrophorese an 2.1%igem Gel nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (Dauereinbau, 10 µc/ml). a) Gesamtnucleinsäuren. b) RNase-Abbau (s.II,5). Elektrophoresebedingungen wie bei Abb.22. —— Optische Dichte •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

In einem weiteren Vorversuch mußte geprüft werden, ob das Verteilungsmuster der Nucleinsäuren nach Färbung mit Methylenblau und Vermessen der Gelstäbe im sichtbaren Licht genauso aussieht, wie wenn die Nucleinsäurebanden direkt im UV-Licht vermessen wurden. Es hat sich gezeigt, daß zwischen den beiden Verfahren keine qualitativen Unterschiede bestehen, sodaß die Ergebnisse, die mit gefärbten Gelen erzielt wurden,

wurden, mit den Pherogrammen ungefärbter Gele verglichen werden können.

Trennt man Nucleinsäuren nach ^{32}P-Dauereinbau auf einem 2.1%igen Gel, erhält man einen mit dem O.D.-Profil koinzidierenden Verlauf der Radioaktivitätskurve (Abb.24). Für die Auftrennung der hmRNS wurde die Laufzeit so gewählt, daß die niedermolekulare RNS den Gelstab schon durchlaufen hat; man findet keine weiteren Radioaktivitätsgipfel mehr.

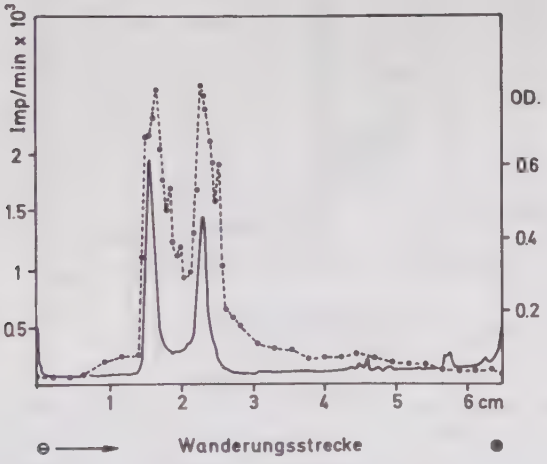


Abb.24: Elektrophorese der Gesamtnucleinsäuren auf 2.1%igem Gel nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat für 36 h (2 h Vorinkubation im phosphatfreien Medium; 10 µc/ml ^{32}P). Laufzeit: 25 min (nmRNS ist durchgelaufen); 5 mA/Gel; TBE-Puffer pH 8.3 —— Optische Dichte •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

Trennt man nun "pulse"-markierte Nucleinsäuren (Inkubationszeit 10 min) ebenfalls an einem 2.1%igen Gel auf, so tritt in den beiden ribosomalen RNS-Komponenten nur sehr geringe Markierung auf; dagegen findet man eine schnellmarkierte, schwere RNS, die weniger gut als die ribosomale RNS in das Gel eindringt (Abb.25). Da diese Komponente die einzige Markierung im hochmolekularen Bereich der RNS enthält, kann sie mit gro-

ßer Wahrscheinlichkeit der Komponente im Saccharosegradienten (Abb.20) gleichgesetzt werden. Außerdem ist es äußerst wahrscheinlich, daß die "pulse"-markierte RNS bei MAK-Trennungen (Abb.11 und 12) wenigstens zu einem großen Teil mit dieser elektrophoretisch abgetrennten Komponente identisch ist.

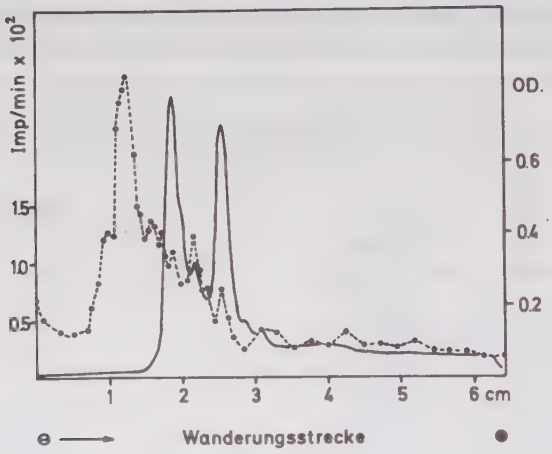


Abb.25: Elektrophorese der Gesamtnucleinsäuren auf 2.1%igem Gel nach Inkubation der Zellen mit ^{32}P-Orthophosphat (20 µc/ml) für 10 min. Elektrophoresebedingungen wie in Abb.24 —— Optische Dichte •– –• ^{32}P-Radioaktivität (Imp/min).

Es wurde nun versucht, die Größenordnung der selektiv markierten RNS zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden die Sedimentationskoeffizienten für hm_1RNS = 18s und hm_2RNS = 25s (LOENING 1968) angenommen und zur elektrophoretischen Wanderungsstrecke in Beziehung gesetzt, die beiden Punkte verbunden und an Hand der Wanderungsstrecke der schnellmarkierten RNS deren Sedimentationskoeffizient extrapoliert (Abb.26). Man erhält dabei einen Wert von 32s.

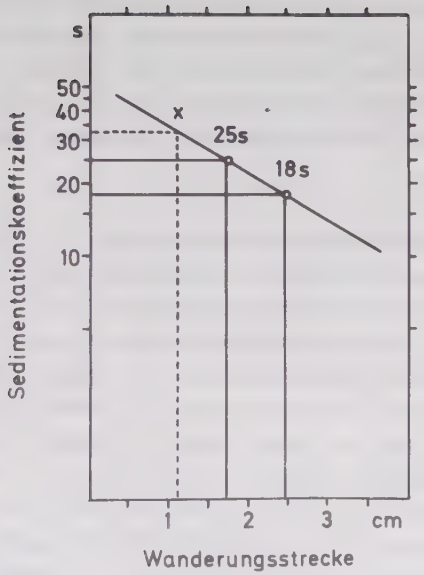


Abb.26: Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten der schnell-markierten RNS an Hand der elektrophoretischen Wanderungsstrecke. Abszisse: Elektrophoretische Wanderungsstrecke in cm; Ordinate: Sedimentationskoeffizient in Svedberg-Einheiten.

IV. DISKUSSION

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, darf schnellmarkierte RNS nicht mit messenger-RNS gleichgesetzt werden. Um Ergebnisse verschiedener Trennverfahren miteinander vergleichen zu können, müssen für die schnellmarkierte RNS Charakteristika gefunden werden, die ein Wiedererkennen der entsprechenden Komponente ermöglichen. Ein Merkmal der schnellmarkierten RNS ist der hohe AMP-Gehalt bei MAK-Chromatographie. Als weiteres Kriterium wurde die selektive Markierung nach 10 min ^{32}P-Angebot herangezogen.

Neben der messenger-RNS kommen in unserem Fall noch die Vorstufen der ribosomalen RNS als schnellmarkierte Komponenten in Frage. Über die Synthese der ribosomalen RNS bei Säugerzellen läßt sich folgendes zusammenfassen (LOENING 1968): Eine schnellmarkierte Vorstufe der ribosomalen RNS mit einem Sedimentationskoeffizienten von 45s (WEINBERG u.Mitarb. 1967) zerfällt im Nucleolus in eine 32s und 18s RNS; die letztere wird ins Cytoplasma geschleust und bildet dort die hm_1RNS (18s). Mit einer zeitlichen Verzögerung von 1 h wird die 32s RNS ebenfalls im Nucleolus in hm_2RNS (28s) umgewandelt und ins Cytoplasma abgegeben. Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich die Molekulargewichte der RNS bestimmen (LOENING 1969); auf diese Weise läßt sich feststellen, daß bei diesen Umwandlungsschritten eine RNS abgespalten wird, über deren Verbleib noch nichts bekannt ist.

Dieser Syntheseweg ist für pflanzliche Gewebe noch nicht endgültig bestätigt. LOENING (1967) konnte in der Kernfraktion von Erbsen eine 45s RNS nachweisen; inzwischen ist auch die 32s RNS gesichert (LOENING, persönliche Mitteilung). FABER u.VINCENT (1969) konnten kürzlich bei Hefe eine 38s RNS als Vorstufe der ribosomalen RNS nachweisen.

YOSHIKAWA-FUKADA u.Mitarb. (1965) fanden bei Säugerzellen auf MAK-Chromatogrammen zwei schnellmarkierte Komponenten im Bereich der hmRNS, die sie als Q_1 und Q_2 bezeichnen, und stellen

die Hypothese auf, daß Q_1 mit einem ribosomalen Basenverhältnis eine ribosomale Vorstufe darstellt. Bei Auftrennung der RNS im Saccharosegradienten wurden ähnliche Verhältnisse beobachtet. YOSHIKAWA-FUKADA (1967) konnte den Vorstufencharakter bestätigen, als bei Unterbrechung der Proteinsynthese mit Puromycin oder Cycloheximid die Vorstufe der ribosomalen RNS angehäuft wurde. YOSHIKAWA-FUKADA u.Mitarb. (1965) ordneten die Q_2-Komponente auf Grund ihrer Basenzusammensetzung der DNS-ähnlichen RNS zu. MILLER u.Mitarb. (1968) konnten bei HeLa-Zellen die RNS des Q_2-Gipfels in den Polysomen wiederfinden.

Vergleicht man diese Befunde mit den Daten der vorliegenden Arbeit, läßt sich folgendes aussagen:
Bei Auftrennung der Gesamtnucleinsäuren mit Hilfe der Gelelektrophorese konnte eine schnellmarkierte Komponente gefunden werden, die nach einer graphisch durchgeführten Extrapolation einen Sedimentationskoeffizienten von 32s besitzt. Bei selektiver Markierung wird auf dem Saccharosegradienten ebenfalls eine schnellmarkierte RNS von der hm_2RNS abgetrennt. Der nachlaufende Radioaktivitätsgipfel auf MAK-Chromatogrammen ist dann bei selektiver Markierung wenigstens zum größten Teil als ribosomale Vorstufe zu deuten. Die starke Zunahme der Aktivität in hm_1 und hm_2RNS unter "Chase"-Bedingungen ist sicher zu einem Teil auf Umwandlung der Vorstufe in ribosomale RNS zurückzuführen. Der Hauptgipfel der Radioaktivität bei MAK-Chromatogrammen (Abb.11) und bei Gradientenzentrifugation (Abb.20 und 21) würde demnach als Vorstufe der ribosomalen RNS zu deuten und mit der Q_1RNS (s.o.) identisch sein. Die Schulter bei MAK-Trennungen (Abb.11) und der kleine Gipfel bei Gradientenzentrifugation (Abb.21) entspricht wahrscheinlich der Q_2RNS, die nach den Daten von MILLER u.Mitarb. (1968) als DNS-ähnliche RNS angesprochen werden kann.

Warum erscheint bei der Gelelektrophorese nur die 32s- und nicht die 45s-Vorstufe. Die eine Möglichkeit könnte sein, daß sie sehr schnell in 32s und 18s RNS umgebaut wird und deshalb gar nicht mehr erfaßt werden kann. Eine andere Erklärung wäre, daß

sie nicht extrahiert wird. SCHERRER u.Mitarb. (1963) und andere Autoren geben an, daß sich dieses große Molekül nur mit warmem Phenol extrahieren läßt.

Wenn die Hauptmasse des Radioaktivitätsgipfels der MAK-Trennung der ribosomalen Vorstufe zugeordnet wird, wie ist dann die AMP-reiche Basenzusammensetzung zu deuten? Verschiedene Autoren bezeichnen diese AMP-reiche RNS als messenger-RNS. Vor allem die Ergebnisse von LIN u.Mitarb. (1966), die diese Komponente an Polysomen wiedergefunden haben, sind ein starkes Argument dafür. Da diese RNS-Komponente immer als DNS-ähnlich bezeichnet wird, wurde hier die Basenzusammensetzung der DNS zum Vergleich herangezogen. Es zeigte sich, daß von der DNS her betrachtet der hohe AMP-Gehalt erklärbar ist. WILLEMS u.Mitarb. (1968) dagegen geben für die 32s RNS von HeLa-Zellen einen geringen AMP-Gehalt (13.6%) an. Dies steht im Gegensatz zu unseren Befunden. Wie ist diese Diskrepanz zu deuten?

1) Die AMP-reiche RNS ist ein Kunstprodukt, durch Präparations- und Trennmethoden hervorgerufen.

2) Die schnellmarkierte RNS besteht zum größten Teil aus ribosomaler Vorstufe, von der zumindest auf MAK- die AMP-reiche RNS nicht vollständig abgetrennt ist.

Zu Punkt 1): ELLEM (1966) hat gezeigt, daß eine große Menge schnellmarkierter RNS an die MAK-Säule gebunden wird;diese gebundene RNS hat einen noch höheren AMP-Gehalt als die DNS-ähnliche RNS (EWING u.CHERRY 1968: 49.0%). Sie wird als "tenaciously-bound RNA" bezeichnet. Es könnte sogar sein, daß Poly-AMP mit der schnellmarkierten RNS aggregiert und die Basenzusammensetzung dadurch verfälscht wird (LOENING 1968). HAYES u.Mitarb. (1966) geben an, daß beim Mixen von schnellmarkierter und ribosomaler RNS von E.coli ein Aggregat entsteht. Eine weitere Möglichkeit ist die ungleichmäßige Markierung der Nucleotide - also bevorzugt AMP -, die bis heute noch nicht widerlegt ist. Diese Punkte würden die Basenzusammensetzung als Charakterisierungsmerkmal für messenger-RNS in Frage stellen.

Zu Punkt 2): Nach den Ergebnissen von YOSHIKAWA -FUKADA und

Mitarb. (1965) ist die DNS-ähnliche RNS mit dem zweiten Gipfel der MAK-Chromatogramme und der Gradientenzentrifugation identisch.

Welche Aussagen lassen sich dazu nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit machen? Der hohe AMP-Gehalt konnte nach Auftrennung im Saccharosegradienten nicht bestätigt werden. Diese Tatsache spricht dafür, daß bei MAK-Chromatographie ein Artefakt entsteht und eine Basenzusammensetzung mit hohem AMP-Gehalt vorgetäuscht wird. Andrerseits könnte die AMP-reiche Komponente der Schulter des MAK-Chromatogramms und dem zweiten Gipfel der Gradientenzentrifugation zugeordnet werden. Diese Komponente wäre nach den Ergebnissen der fraktionierenden Zentrifugation, wo sie bei einer groben Reinigung der Ribosomen im Sediment nachgewiesen werden konnte, analog zu den Ausführungen von LIN u.Mitarb. (1966) als messenger-RNS anzusprechen. Auf der anderen Seite müßte sich m-RNS durch Dissoziation der Ribosomen (HUEZ u.Mitarb. 1967) ablösen lassen; und dies konnte nicht erreicht werden. Dieses Problem ist aber erst zu lösen, wenn Basenanalysen von schärferen Trennungen (Gelelektrophorese) vorliegen. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, die RNS an ihrem Entstehungsort (Kern) oder an ihrem Erfolgsort (Polysomen) besser voneinander zu trennen; mit anderen Worten, es müßten saubere Kern- und Polysomenpräparate hergestellt werden. Noch günstiger wäre es, die RNS des Nucleolus von der Kerns abzutrennen.

Beim augenblicklichen Stand läßt sich immer noch nichts Endgültiges zur messenger-RNS bei höheren Pflanzen sagen, und es ist verfrüht, die AMP-reiche RNS als solche zu bezeichnen.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Es wurden Methoden für sterile Suspensionskulturen von Petroselinum sativum entwickelt und zur Untersuchung des Nucleinsäurestoffwechsels herangezogen.
2) Bei kurzer Markierung mit radioaktivem Phosphat und anschließender MAK-Chromatographie konnten im Bereich der niedermolekularen und der hochmolekularen RNS schnellmarkierte Komponenten gefunden werden. Die letztere wurde näher untersucht.
3) Mit Hilfe von "Chase"-Experimenten wurde eine Lebensdauer dieser Fraktion von ca 4 h ermittelt.
4) Bei fraktionierender Zentrifugation findet sich diese RNS im Ribosomensediment wieder.
5) Die schnellmarkierte RNS ist als DNS-ähnliche RNS mit einem hohen AMP-Gehalt identifiziert worden.
6) Es ist gelungen, die Komponente selektiv zu markieren.
7) Nach Zentrifugation im Dichtegradienten wurde ermittelt, daß sie schwerer als die 25s RNS ist. Die Bestimmung der Basenzusammensetzung ergab keinen so hohen AMP-Gehalt wie bei der MAK-Chromatographie.
8) Bei Elektrophoreseauftrennung zeigt sich ebenfalls eine selektiv markierte komponente, deren Sedimentationskoeffizient durch Extrapolation mit 32s angegeben werden kann. Diese Eigenschaft spricht für die Identität mit der 32s-Vorstufe der ribosomalen RNS.
9) Es wird diskutiert, inwieweit die schnellmarkierte RNS bei MAK-Chromatographie, Gradientenzentrifugation und Elektrophorese die gleiche Komponente darstellt, und wie die DNS-ähnliche RNS einzuordnen ist.

Frau Dr.A.Grahle danke ich für ihre Hilfe bei der Mikrophotographie. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk sei für apparative Unterstützung gedankt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Beiderbeck,R.: Dissertation, Tübingen (1968)
Bergmann,L.: Planta 74, 243 (1967)
Bergmann,L. und Ch.Berger: Planta 69, 58 (1966)
Brawerman,G., D.A.Hufnagel and E.Chargaff:
Biochim.Biophys.Acta 61, 340 (1962)
Cherry,J.H.: Science 146, 1066 (1964)
Cherry,J.H. and R.van Huystee: Plant Physid. 40, 987 (1965)
Ellem,K.A.O.: J.MolBiol. 20, 283 (1966)
Ewing,E.E. and J.H.Cherry:
Biochim.Biophys.Acta 161, 331 (1968)
Hayashi,M.N., M.Hayashi and S.Spiegleman:
Biophys.J. 5, 231 (1965)
Hayes,D.H., F.Hayes and M.F.Guérin:
J.Mol.Biol. 18, 499 (1966)
Hemleben-Vielhaben,V.: Z.f.Naturforschg. 21b, 983 (1966)
Hock,B.: Plant Physiol. 42, 1149 (1967)
Huez,G., A.Burny, G.Marbaix and B.Lebleu:
Biochim.Biophys.Acta 145, 629 (1967)
Ingle,J and J.L.Key: Plant Physiol. 40 1212 (1965)
Key,J.L. and J.Ingle: Proc.Nat.Acad.Sci.(US) 52, 1382 (1964)
Koblitz,H. und I.Hagen: Flora 152, 447 (1962)
Kirby,K.S.: Biochem.J. 96, 266 (1965)
Kuhl,A. and H.Lorenzen: Methods in Cell Physiology, Vol.I,
p.159, Academic Press, New York and London (1964)
Lin,C.Y., J.L.Key and C.E.Bracker:
Plant Physiol. 41, 976 (1966)
Loening,U.E.: Biochem.J. 97, 125 (1965)
Loening,U.E.: Biochem.J. 102, 251 (1967)
Loening,U.E.: Ann.Rev.Plant Physiol. 19, 37 (1968)
Loening,U.E.: Chromatographic and Electrophoretic Techniques,
Vol.II, p.437, W.Heinemann (Medical Books) Ltd.,
London (1968b)
Loening,U.E.: Biochem.J. 113, 131 (1969)
Loening,U.E. and J.Ingle: Nature 215, 363 (1967)
Lonberg-Holm,K.K.: Nature 213, 454 (1967)

Mandell,J.D. and A.D.Hershey: Analyt.Biochem. 1, 66 (1960)
Marcot-Queiroz.J., J.Julien, R.Rosset et R.Monier:
Bull.Soc.Chim.Biol.Paris 47, 183 (1965)
Melchers,G.: Ber.Dtsch.Bot.Ges. 78, 21 (1965)
Miller,A.O.A., E.Dhont, A.M.deVreese and L.van Nimmen:
Biochem.Biophys.Res.Comm. 33,702 (1968)
Murashige,T. and F.Skoog: Physiol,Plantarum 15, 473 (1962)
Murphy,M.N. and J.S.Lovett: Develop.Biol. 14, 68 (1966)
Richter,G. and H.Senger: Biochim.Biophys.Acta 87, 502 (1964)
Richter,G. and H.Senger: Biochim.Biophys.Acta 95, 362 (1965)
Ruppel,H.G.: Z.f.Naturforschg. 23b, 997 (1968)
Scherrer,K., H.Latham and J.E.Darnell:
Proc.Nat.Acad.Sci.(US) 49, 240 (1963)
Schuit,K.E. and D.E.Buetow: Biochim.Biophys.Acta 166, 702 (1968)
Taber,R.L. and W.S.Vincent:
Biochim.Biophys.Acta 186, 317 (1969)
Weinberg,R.A., U.E.Loening, M.Willems and S.Penman:
Proc.Nat.Acad.Sci.(US) 58, 1088 (1967)
Willems,M., E.Wagner, R.Laing and S.Penman:
J.Mol.Biol. 32, 211 (1968)
Wollgiehn,R. und M.Ruess:
Z.f.Naturforschg. 23b, 1198 (1968)
Yoshida,K., K.Umemura, K.Yoshinaga and Y.Oota:
Plant and Cell Physiol. 8, 97 (1967)
Yoshikawa-Fukada,M.: Biochim.Biophys.Acta 145, 651 (1967)
Yoshikawa-Fukada,M., T.Fukada and Y.Kawade:
Biochim.Biophys.Acta 103, 383 (1965)

Lebenslauf

Am 6.Juni 1939 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Otto Seitz und seiner Ehefrau Maria geb.Kirchner in Stuttgart geboren. Nach dem Besuch der Grundschule von 1946 bis 1950 trat ich in das Georgii-Gymnasium in Esslingen a.N. ein, wo ich 1960 das Abitur ablegte. Im gleichen Jahr begann ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit dem Studium der Biologie, Chemie und Geographie. Im Sommersemester 1963 beschäftigte ich mich an der Universität Innsbruck vor allem mit Botanik. Danach kehrte ich an die Universität Tübingen zurück und legte 1964 das Philosophikum ab. 1966 fertigte ich unter der Leitung von Prof.Dr.E.Bünning eine Zulassungsarbeit über das Thema "Kulturversuche mit Spaltöffnungen" an. 1967 schloß ich mein Studium durch die Prüfung für das Lehramt an höheren Schulen in den Fächern Biologie, Chemie und Geographie ab. Während meines Studiums beschäftigte ich mich auf Studienreisen in einige Mittelmeerländer, in die Türkei, nach Nordostafrika und in die zentrale Sahara mit geomorphologischen Fragen in Trockengebieten. 1967 begann ich unter der Anleitung von Prof.Dr.G.Richter am Botanischen Institut Tübingen mit den Experimenten zum Nucleinsäurestoffwechsel von pflanzlichen Gewebekulturen.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren:
Bayer, Blume, Bretschneider, Bünning, Gams, Gieseler, Grell, Hassenstein, Huber, Krüger, Mägdefrau, Metzner, Möhres, E.Müller, Nultsch, Richter, Risler, Rüdorff, Schönenberg, Schröder, Schwartz, Schwemmle, Wagner, Weitzel, Wilhelmy.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen